



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização microbiológica e molecular das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas em amostras clínicas, águas residuais e alimentos na região de Luanda e dos seus perfis de resistência aos antimicrobianos – o seu impacto na saúde pública.

Moisés Francisco

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ESPECIALIDADE MICROBIOLOGIA

MARÇO, 2018



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização microbiológica e molecular das estirpes de *Salmonella spp* isoladas em amostras clínicas, águas residuais e alimentos na região de Luanda e dos seus perfis de resistência aos antimicrobianos – o seu impacto na saúde pública.

Autor: Moisés Francisco

Orientador: Professor Doutor Miguel Viveiros

Coorientadora: Professora Doutora Constança Pomba

Membros da Comissão Tutorial: Professora Doutora Isabel Couto

Professora Doutora Filomena Pereira

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Especialidade de Microbiologia

Lista de Publicações

Esta Dissertação originou as seguintes publicações:

- Artigo em jornal científico com “peer-review”

Francisco, M., Costa, S. S., Belas, A., Ramos, J., Couto, I., Pomba, C., & Viveiros, M. (2018) First report of antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhi isolated in Luanda, Angola. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [E-pub ahead of print]

- Manuscrito em preparação

Francisco, M., Belas, A., Costa, S. S., Ramos, J., Couto, I., Pomba, C., & Viveiros, M. Molecular patterns and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* non Typhi isolated from human specimens, Food and Environment samples in Luanda, Angola.

- Comunicação sob a forma de “poster”

Francisco, M., Costa, S. S., Belas, A., Ramos, J., Couto, I., Pomba, C., & Viveiros, M.. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhi isolated in Luanda, Angola, in human specimens during 2013-2014. *Ciência* 2017. 3-5 Julho 2017, Lisboa, Portugal.

Francisco, M., da Silva, F. G., Manuel, A., & Viveiros, M. Monitoring antimicrobial resistance in *Salmonella* spp. strains isolated at the National Institute of Public Health in Angola. P372. In Livro de abstracts, pp 496. National Congress of Microbiology and Biotechnology 2013 (MicroBiotec13). 6-8 Dezembro 2013, Aveiro, Portugal.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

“Fernando Pessoa”

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos quanto tornaram possível a realização do mesmo e em especial a minha família e em particular esposa e filhos.

Nicolau Angelo Francisco; Kelvin Nicolau Francisco; Yanik Valente Francisco;

Kelly Wiza Francisco; Geovani Valente Francisco; Indira Valente Francisco;

Esposa, Luísa Angelo Francisco

Aos meus pais: Francisco Luvumbo e Maria Puxi

Agradecimentos

Agradecimentos para as instituições que tornaram possível o trabalho:

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Laboratório de Resistência e Biocidas- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto

Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola

Clínica Sagrada Esperança, Luanda-Angola

Agradecimentos a pessoas que tornaram possível este trabalho:

Agradecimento ao Grupo da Unidade de Ensino e investigação de Microbiologia Médica, do IHMT

Agradecimento muito especial a Sofia Santos Costa, e a Adriana Belas, pelo empenho e ajuda neste trabalho.

Agradecimentos a Jorge Ramos, que fez parte da nossa equipa de trabalho

Agradecimentos para a equipa tutorial em especial para o meu Tutor directo Prof Doutor Miguel Bettencourt Viveiros Bettencourt e a Co-tutor Professora Doutora Constança Pomba

Agradecimentos para a Professora Doutora Isabel Couto, pelos conselhos e observações

Finalmente, agradecer ao colectivo de professores do IHMT que contribuíram bastante nos conhecimentos.

Resumo

As infecções por *Salmonella* spp. são comuns em África, estando entre as principais causas de morbilidade e mortalidade em humanos, com impacto para a saúde pública. Não existe registo científico da sua situação em Angola apesar dos inúmeros registos informais e suspeitas clínicas destas infecções associadas a doença entérica e perfurações intestinais. Este trabalho consistiu no isolamento e caracterização dos diferentes serovares de *Salmonella* que circulam em Luanda, Angola, relativamente aos seus padrões de resistência aos antimicrobianos e relação epidemiológica, em particular entre isolados clínicos, ambientais e alimentares, e compreender o seu impacto na saúde pública angolana. Das 290 amostras colhidas entre Agosto de 2013 e Novembro de 2015, foram obtidos 65 isolados de *Salmonella* spp. identificados por provas bioquímicas (galeria API). A confirmação do género *Salmonella* foi feita por amplificação do gene *invA*. Todos os isolados foram serotipados com base no esquema de Kauffmann-White-Le Minor e tipados molecularmente por XbaI-PFGE. Isolados representativos foram ainda analisados por MLST. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi obtido por determinação de concentrações mínimas inibitórias, e os seus determinantes de resistência pesquisados por PCR.

Dos 65 isolados de *Salmonella* spp., 10 corresponderam a *S. enterica* serovar Typhi, colhidos em pacientes com suspeita clínica de febre tifóide ou doença entérica. Nelas foi detectada resistência ao trimetoprim-sulfametoxazole (n=6), aos beta-lactâmicos (n=5), ao cloranfenicol (n = 1) e ainda susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina (n = 2). A tipagem molecular por XbaI-PFGE revelou oito pulsotipos, associados por MLST a três sequências-tipo: ST1, ST2 e ST8, sendo ST2 predominante.

Os restantes 55 isolados de *Salmonella* spp. (de origem clínica (32, 58%); ambiental (13, 22.4%); alimentar (10, 18.2%)) corresponderam ao serovar Enteritidis (17, 30.9%), ao serovar Typhimurium (12, 21.8%), e em particular à sua importante e altamente virulenta variante monofásica 4[5],12:i:- (21, 38.1%). O padrão de resistência mais frequente foi a resistência à colistina (5, 9.0%), seguido-se de resistência à ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazole (2, 3.6 %). A tipagem molecular discriminou 4 pulsotipos (A a D), sendo o pulsotipo B o mais frequente (n=28, 20 de 4[5],12:i:-, 4 Typhimurium e 4 de serovar desconhecido), o qual foi associado à linhagem clonal ST313. O segundo pulsotipo mais frequente, A, com 20 isolados, maioritariamente Enteritidis e associados à linhagem ST11. O pulsotipo C, com 4 isolados, 3 Typhimurium e 1 de serovar desconhecido, foi relacionado a um novo ST. Por sua vez, o pulsotipo D, com três isolados Typhimurium todos associados ao ST1561. Todos os pulsotipos encontrados continham amostras de origem clínica, alimentar e ambiental, revelando as fontes de transmissão deste agente, à exceção do pulsotipo D composto apenas por isolados de origem ambiental.

Estes resultados fornecem, pela primeira vez, uma primeira caracterização microbiológica e molecular da situação epidemiológica das infecções por *Salmonella* spp. em Luanda, e evidenciam a necessidade de contínuo monitoramento deste agente patogénico ao nível clínico, alimentar e ambiental para que se implementem estratégias epidemiológicas para o controlo da febre tifóide e de outras salmoneloses em Angola.

Palavras-Chave: *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi, Resistência a Antimicrobianos, Luanda, Angola

Abstract

Infections caused by *Salmonella* spp. are common in Africa and amongst the main causes of morbidity and mortality in humans, with a public health impact. There is no scientific record of their situation in Angola, despite the innumerable records of informal and clinical suspicions of these infections as cause of enteric disease and intestinal perforations. This work involved the isolation and characterization of the different *Salmonella* serovars circulating in Luanda, Angola, regarding their antimicrobial resistance patterns and epidemiological relationship, particularly between clinical, environmental and food isolates and their impact on public health in Angola.

From 290 samples collected between August 2013 and November 2015, 65 isolates of *Salmonella* spp. were identified by biochemical tests (API gallery). Confirmation of the genus *Salmonella* was achieved by amplification of the *invA* gene. All isolates were serotyped based on the Kauffmann-White-Le Minor scheme and typed by XbaI-PFGE representatives isolates of the clones detected were further analyzed by MLST. The antimicrobial susceptibility profile was obtained by determining their minimum inhibitory concentrations and their resistance determinants were screened by PCR.

Of the 65 isolates of *Salmonella* spp., 10 corresponded to *S. enterica* serovar Typhi, collected in patients with clinical suspicion of typhoid or enteric disease. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole (n = 6), beta-lactams (n = 5), chloramphenicol (n = 1) and reduced susceptibility to ciprofloxacin (n = 2) were detected. Molecular typing by XbaI-PFGE revealed eight pulsotypes and three MLST-associated sequence-types: ST1, ST2 and ST8, being ST2 predominant.

The remaining 55 isolates of *Salmonella* spp., (of clinical origin (32,58%); environmental (13, 22.4%); food (10, 18.18%)), corresponded to serovar Enteritidis (17, 30.9%), Typhimurium (12, 21.8%), and in particular of its important and highly virulent monophasic variant 4[5],12:i:- (21 isolates. The most frequent resistance pattern was resistance to colistin in 5 isolates (9.0%), followed by resistance to ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacilin, chloramphenicol and trimethoprim-sulfamethoxazole in 2 isolates (3.6%). Molecular typing discriminated 4 pulsotypes (A to D), with pulsoytp B being the most frequent (n = 28, 20 being serovar 4[5],12:1:-, 4 Typhimurium and 4 serovar unknown), associated with clonal line ST313 by MLST. The second most frequent pulsotype was A, represented by 20 isolates, mainly serovar Enteritidis, associated to ST11 lineage. Pulsotype C, composed of 4 isolates, 3 Typhimurium and 1 unknown serovar, was related to a new ST. The D pulsotype, contained three Typhimurium isolates all associated with ST1561. All pulsotypes contained samples of clinical, food and environmental origin, revealing the sources of transmission of this agent, except for pulsotype D composed only by environmental isolates.

These results provide, for the first time, an initial microbiological and molecular characterization of the real epidemiological situation of *Salmonella* spp. infections in Luanda and demonstrate the need for continuous monitoring of this pathogenic agent at the clinical, food and environmental levels to implement epidemiological strategies for the control of typhoid fever and other salmonellosis in Angola.

Keywords: *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi, Antimicrobial Resistance, Luanda, Angola

Índice Geral

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Índice Geral	x
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas.....	xviii
Lista de Abreviaturas	xv
 1. INTRODUÇÃO	 1
1.1. O contexto de salmonelose a nível global	2
1.1.1. Generalidades sobre o género <i>Salmonella</i> .	6
1.1.2. Salmoneloses no Homem	9
1.1.3. Salmoneloses em animais	10
1.1.4. Salmoneloses e o meio ambiente	11
1.1.5. Vias de transmissão	11
1.1.6. Diferentes serovares	13
1.1.6.1. Diferentes linhagens clonais de <i>Salmonella enterica</i>	14
1.1.7. Epidemiologia global	17
1.2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	20
1.2.1. Resistência aos beta-lactâmicos	24
1.2.2. Resistência às quinolonas/fluoroquinolonas	26
1.2.3. Resistência às tetraciclinas	28
1.2.4. Resistência aos fenicóis	28
1.2.5. Resistência aos aminoglicosídeos	29
1.2.6. Resistência ao trimetoprim	20
1.2.7. Resistência às sulfonamidas	31
1.3. Identificação de <i>Salmonella</i> spp. em rotina microbiológica em Angola	31
1.3.1. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.	32
1.3.2. Identificação de género	36
1.3.3. Identificação de serovar	37
1.3.4. Genotipagem por PFGE e MLST	38
1.3.5. Tipificação por bacteriófagos	39
1.3.6. Caracterização de plasmídeos	40
1.4. Patogénese e tratamento	41
1.5. Epidemiologia da salmonelose em África e no contexto do Sistema Nacional de Saúde de Angola	42
1.5.1 Epidemiologia da Salmonelose em África.....	42

1.5.2 Epidemiologia da salmonelose no contexto do sistema Nacional de Saúde de Angola.....	45
1.5.3 Serviços de comércio e bens alimentares em Angola.....	48
1.5.4. Organização dos serviços básicos de saúde em Angola.....	50
1.5.5 - Os serviços clínico-laboratorial prestados às populações em Angola e o seu impacto no controlo das infecções por <i>Salmonella</i> spp.....	55
1.5.6 - Vigilância epidemiológica e segurança alimentar em Angola.....	57
1.5.7 - Saneamento do meio ambiente em Angola.....	59
2. OBJECTIVOS.....	62
2.1. Objectivo geral	63
2.2. Objectivos específicos.....	63
3. MATERIAL E METODOS.....	64
3.1. Origem das amostras.....	65
3.2. Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp.	66
3.3. Confirmação da identificação de <i>Salmonella</i> spp.	69
3.3.1. Serotipificação.....	69
3.4. Extração de DNA.....	70
3.5. Confirmação molecular do género <i>Salmonella</i>	71
3.6. Confirmação molecular do serovar Typhimurium e a sua variante monofásica O:1,4[5],12:i:-.....	72
3.7. Tipificação molecular.....	73
3.7.1. Electroforese em campo pulsado (PFGE).....	73
3.7.2. “Multilocus sequence typing” (MLST).....	75
3.7.3 Identificação do haplotipo H58 de <i>S. enterica</i> ser. Typhi.....	76
3.8. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	77
3.9. Detecção de determinantes de resistência a antimicrobianos.....	77
3.10. Análise estatística.....	82
4. RESULTADOS.....	83
4.1. <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhi.....	84
4.1.1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	86
4.1.2. Tipagem molecular das <i>S. enterica</i> ser. Typhi.....	90
4.2. <i>Salmonella enterica</i> não Typhi.....	91
4.2.1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	93
4.2.2. Tipagem molecular das <i>S. enterica</i> não Typhi.....	101
4.2.3. Análise estatística.....	103
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	104
5.1. Considerações finais e desafios para o futuro do controlo das salmoneloses em Angola.....	115
6. REFERÊNCIAS.....	118

Índice de Figuras

Figura 1. Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos	23
Figura 2. Venda de carne em condições não adequadas no mercado informal de Luanda, Angola.....	58
Figura 3. Aspectos de saneamento básico na comunidade: problemas e consequências para a saúde.....	60
Figura 4. Factores predisponíveis para a emergência da salmonelose em Angola.....	61
Figura 5. Distribuição das 290 amostras biológicas segundo a sua origem.....	65
Figura 6. Proveniência das 290 amostras biológicas, cidade de Luanda, Angola.	66
Figura 7. Morfologia de <i>Salmonella</i> spp. em placas de Hektoen e XLD.....	68
Figura 8. Análise de produtos de PCR do gene <i>invA</i> por electroforese em gel de agarose.....	72
Figura 9. Distribuição em percentagem dos 10 isolados de <i>S. enterica</i> ser. Typhi segundo a origem geográfica dos pacientes.....	85
Figura 10. Perfil bioquímico característico de <i>S. enterica</i> ser. Typhi pelo sistema API.....	85
Figura 11. Relação clonal de isolados de <i>S. enterica</i> ser. Typhi	90
Figura 12. Caracterização molecular por XbaI-PFGE das 10 estirpes de <i>S. enterica</i> ser. Typhi	91
Figura 13. Relação clonal entre os 55 isolados de <i>S. enterica</i> não Typhi.....	102

Índice de Tabelas

Tabela 1: Perfil bioquímico do género <i>Salmonella</i>	7
Tabela 2: Classificação de <i>Salmonella</i> spp; subespécie, serovar e habitat pelo sistema - Kauffman-White	13
Tabela 3: Resumo de casos de febre tifóide 2013-2016 em Angola	47
Tabela 4: Principais indicadores de saúde em Angola e na região Africana	51
Tabela 5: Proveniência das amostras clínicas 2013-2015	67
Tabela 6: Programa amplificação e primers utilizados para detecção de um fragmento interno do gene <i>invA</i> e confirmação do género <i>Salmonella</i>	72
Tabela 7: Programa de amplificação e oligonucleotidos utilizados para confirmação de <i>S. enterica</i> ser. Typhimurium e variante O:1,4[5],12:i:-	73
Tabela 8: Lista de oligonucleótidos e programas de amplificação utilizados para MLST	76
Tabela 9: Oligonucleótidos e programa de amplificação utilizado para identificação de H58	77
Tabela 10: Programas de amplificação e oligonucleótidos utilizados para detecção de determinantes de resistência a antimicrobianos	79
Tabela 11: Programas de amplificação usados ao longo do trabalho para detecção de resistência aos antimicrobianos	81
Tabela 12: Dados clínicos, tratamento e evolução dos pacientes com infecção por <i>S. enterica</i> ser. Typhi em Luanda, Angola, 2013-2014	84
Tabela 13: Padrões de resistência a antibióticos encontrados nos dez isolados de <i>S. enterica</i> ser. Typhi, de acordo com as recomendações CLSI (2016)	87
Tabela 14: Valores CMI de antibióticos beta-lactâmicos para os dez isolados de <i>S. enterica</i> ser. Typhi em estudo	88
Tabela 15: Valores de CMI de vários antibióticos para os dez isolados de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhi em estudo	89
Tabela 16: Distribuição dos serovares dos 65 isolados de <i>Salmonella</i> spp. por tipo de amostra biológica	92
Tabela 16a Distribuição dos serovares dos 55 isolados de <i>Salmonella</i> não Typhi	92
Tabela 17: Valores de CMI de antibióticos beta-lactâmicos para os isolados de <i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis em estudo.	94
Tabela 18: Valores de CMI de vários antibióticos para os isolados de <i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis em estudo	95
Tabela 19: Valores de CMI de antibióticos beta-lactâmicos para os isolados de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium em estudo	96
Tabela 20: Valores de CMI de vários antibióticos para os isolados de <i>S. enterica</i> ser. Typhimurium em estudo	97
Tabela 21: Valores de CMI de antibióticos beta-lactâmicos para os isolados de <i>Salmonella enterica</i> ser. 4[5],12:i:- em estudo	98
Tabela 22: Valores de CMI de vários antibióticos para os isolados de <i>Salmonella enterica</i> ser. 4[5],12:i:- em estudo	99

Tabela 23. Valores de CMI de antibióticos beta-lactâmicos para os isolados de <i>Salmonella enterica</i> não serotipáveis em estudo	100
Tabela 24. Valores de CMI de vários antibióticos para os isolados de <i>Salmonella enterica</i> não serotipáveis em estudo.	100
Tabela 25: Padrões de resistência aos antimicrobianos das estirpes de <i>Salmonella</i> não Typhi e a presença de genes de resistência	101
Tabela 26: Cruzamento de amostras clínicas com ambientais e alimentares	103

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico
ARN – Ácido ribonucleico
ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro
ARNt – Ácido ribonucleico de transferência
A/S - Ampicilina /sulbactam
AMP – Ampicilina
BIOHAZ – Painel da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar sobre Perigos
Biológicos, “European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards”
CPDE- Centro de Processamento de dados Epidemiológicos
CDC – Centros para a Prevenção e Controlo de Doenças, “Centers for Disease Control
and Prevention”
CMI – Concentração Mínima Inibitória
CLSI – Instituto de Standards de Laboratórios Clínicos, “Clinical Laboratories
Standards Institute”
C – Cloranfenicol
CECOMA- Central de Compras e aprovisionamento de Medicamentos e Meios
Médicos
COL - Colistina
CIP - Ciprofloxacina
dNTP – Desoxirribonucleótido trifosfato
DT – Tipo Definitivo, “Definitive Type”
ECDC – Centro Europeu para o Controlo e Prevenção de Doenças, “European Center
for Disease Prevention and Control”
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, “European Food Safety
Authority”
ELISA – Ensaio Imunoabsorvente Associado a Enzima, “Enzyme Linked
Immunosorbent Assay”
ENR – Enrofloxacin
ESBL – Beta-lactamases de espectro alargado, “Extended Spectrum Beta-Lactamases”
EUA- Estados Unidos de América
DFWED- Divisão de Doenças Transmitidas por Alimentos, Aquáticas e Ambientais
FFC – Florfenicol
FMV-UTL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa
FOX – Cefoxitina
ISO – Organização Internacional para a Estandarização, “International Standardization
Organization”
IAA- Agência Internacional de Acreditação

ITS- Transcrição da Região Interna “*Internal Transcribed Spacer*” IS-Sequência de Inserção

LRAB – Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas

INSP- Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola

MINSA- Ministério da Saúde de Angola

MLST – Tipagem por Sequenciação Multilocus, “Multilocus Sequence Typing”

MLVA – Análise de Repetições em Tandem de Número Variável Multilocus, “Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis”

MSRV – Rappaport-Vassiliadis Modificado Semi-sólido, “Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis”

MDR – Multirresistente

NA – Ácido Nalidíxico

OMS- Organização mundial da Saúde

QRDR- Região Determinante da Resistência à Quinolonas, “Quinolone Region Determining Resistance”

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia, “Polymerase Chain Reaction”

PFGE – Eletroforese em Campo Pulsado, “Pulsed-Field Gel Electrophoresis”

Pi- piperacilina

PNDS- Programa Nacional de Desenvolvimento sanitário

RVS – Caldo Rappaport-Vassiliadis com Soja, “Rappaport-Vassiliadis Broth with Soy”

S- *Salmonella*

Ser. - Seroovar

S3 – Sulfonamidas compostas

ST – Sequência Tipo, “Sequence Type”

SxT – Sulfametoxazol-trimetoprim

SIDA- Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida

SNPs -Polimorfismos Nucleotídicos Únicos Simples- *Single Nucleotide Polymorphisms*

TAE – Tris-Acetato EDTA; TBE – Tris-Borato EDTA

TE - Tetraciclina

TSI – Triplo Açúcar Ferro, “Triple Sugar Iron”

UPGMA – Método de Agrupamento pelas Médias Aritméticas Não Ponderadas, “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”

UV - Ultravioleta

VNTR – Repetições em Tandem de Número Variável, “Variable Number Tandem Repeats”

W – Trimetoprim

WHOCC-Salm – Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa em *Salmonella* da Organização Mundial de Saúde, “World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*”

XLD – Xilose Lisina Deoxicolato, “Xylose Lysine Deoxycholate”

Lista de Unidades

μl: Microlitro

mM: micromolar

mg: Miligramo

pb: Pares de bases

kpb: Quilopares de bases

1.Introdução

1.1. O contexto de salmonelose a nível global

O interesse por bactérias do género *Salmonella* está relacionado com a sua complexa epidemiologia, patogenicidade, capacidade invasiva, serovares multirresistentes a vários antimicrobianos, genes de virulência e escassez de dados que possam determinar a real significância de genes de resistência transferíveis à cadeia alimentar do Homem. Diversos serovares são associados a infecções em animais e humanos, responsáveis por altas taxas de morbilidade e mortalidade em todo mundo, principalmente em países mais pobres (Sánchez-Vargas, Abu-El-Haija & Gómez-Duarte, 2011; Behraves, *et al.*, 2010). A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos tem sido tema de intensa investigação e discussões nas últimas décadas, devido à preocupação mundial em adoptar estratégias que permitam o controlo das mesmas e, conseqüentemente, garantir produtos seguros no mercado alimentar. A *Salmonella* spp. é uma das espécies bacterianas mais disseminadas na natureza, sendo o Homem e os animais os principais reservatórios naturais, com ocorrência de diferentes serovares nas várias regiões do mundo. As infecções que causam são comumente designadas por salmoneloses *sensu lato*, distinguindo-se em *sensu stricto* do ponto de vista microbiológico, fisiopatológico e clínico da febre tifóide ou paratifóide, causadas pelos serovares Typhi e Paratyphi (Yan, *et al.*, 2003). É considerada como um dos principais agentes envolvidos em surtos infecciosos de origem alimentar, quer em países desenvolvidos quer em países em vias de desenvolvimento, salientando-se desta forma pela sua característica de endemicidade, alta morbilidade e, sobretudo, pela dificuldade da adopção de medidas para o controlo e prevenção da infecção (Guerin, Vold & Aavitsland, 2005). Além da importância das medidas preventivas para evitar o risco de infecção por *Salmonella* spp. na população humana, o controlo desta doença é de grande interesse para a economia dos países. Os custos estimados da alta incidência da salmonelose nos Estados Unidos da América variam entre 1,3 a 4,0 mil milhões de dólares por ano, devido a despesas médicas, ausência ao trabalho e quebras na produtividade (Taitt, *et al.*, 2004). O aumento da incidência da salmonelose provocada por alimentos contaminados demonstra que, apesar dos avanços tecnológicos alcançados, quer na indústria alimentar quer em outras áreas, o problema da salmonelose ainda continua a ocorrer de forma progressiva em todo mundo. Os animais, como as aves e os bovinos, são responsáveis pela enorme disseminação desse agente patogénico. A ampla distribuição de *Salmonella* spp. entre os animais, a existência de portadores

assintomáticos e a sua permanência no ambiente e nos alimentos contribuem para que este microrganismo assuma um papel de grande relevância na saúde pública mundial e, por conseguinte, exigindo a adopção de medidas e programas estruturais e permanentes para o controlo e erradicação da doença (OMS, 2015; Crump, Griffin & Angulo, 2002). Considerando que a maioria dos quadros de gastroenterite ocorrem sem a necessidade de hospitalização e sem o isolamento do agente causal num eventual alimento incriminado, a ocorrência de salmonelose na população humana transmitida por alimentos é subestimada (Santos, *et al.*, 2002). As mudanças no perfil epidemiológico de doenças transmitidas por alimentos devido à expansão dos mercados de consumo, à globalização económica, às alterações dos hábitos alimentares e ao aumento do consumo de alimentos industrializados ou produzidos fora do lar, são factores preponderantes da expansão e morbilidade destas doenças, com maior destaque para as espécies de salmonelas em quase todo o mundo, embora com diferentes impactos em função do desenvolvimento de cada país ou regiões. Por outro lado, a subnotificação dos surtos de origem alimentar pelos serviços de vigilância epidemiológica é uma realidade mundial (OMS, 2015; DFWED-CDC). A percentagem de notificação dos casos de salmonelose varia de país em país em função das políticas e programas adoptadas para o controlo da doença. O agente etiológico da febre tifóide, *Salmonella enterica* serovar Typhi, constitui uma enorme preocupação para a saúde pública devido à sua alta incidência em muitas regiões do mundo, particularmente em países em vias de desenvolvimento de África, Ásia e América Latina, associada a altas taxas de morbilidade e mortalidade. Assume assim contornos preocupantes para as políticas de saúde no século XXI, à luz dos Objectivos do Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas (Sánchez-Vargas, Abu-El-Haija & Gómez-Duarte, 2011). O contexto das salmoneloses deve ser analisado de duas formas distintas: em países desenvolvidos, a atenção recai sobretudo no controlo dos diferentes serovares através da contaminação alimentar assim como na resistência aos antimicrobianos; em países em vias de desenvolvimento, para além destas preocupações, estão ainda associadas outras como o saneamento básico, a falta de estratégias para o controlo da doença, a educação para a saúde da população, a pobreza e as condições de habitabilidade, entre outros elementos chaves no combate e controlo de qualquer doença infecciosa. O aparecimento de estirpes de salmonelas não tifóides invasivas em África, começa a ser uma preocupação da saúde pública. A adaptação destas estirpes às diferentes

condições ambientais, permitem a sua dispersão no ambiente e alimentos, e posterior colonização e infecção do ser humano através de mecanismos de invasão, o que por sua vez permite a manutenção de um ciclo vicioso de re-dispersão para o ambiente, caso não hajam medidas de controlo e sanidade adequadas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 600 milhões de pessoas (pelo menos 1 em cada 10 pessoas) adquirem doença bacteriana entérica depois de consumir alimentos contaminados anualmente, das quais 420 000 morrem (OMS, 2015; Kirk, *et al.*, 2015). As doenças bacterianas diarreicas, com a salmonelose a ocupar lugar de destaque, constituem as doenças mais comuns causadas pelo consumo de alimentos contaminados, infectando anualmente 550 milhões de pessoas, das quais 230 000 perecem (OMS, 2015; Kirk, *et al.*, 2015).

Os aspectos chaves que contribuem para a preocupação actual sobre o controlo da disseminação global das salmoneloses são diversos e transversais, entre eles, a morbilidade associada a clones altamente patogénicos; o surgimento de estirpes invasivas não tifóides; o aumento de taxas de resistência aos antimicrobianos; a adaptabilidade e globalização destas estirpes; a comercialização de animais, vegetais e alimentos para consumo humano e animal entre zonas geográficas distintas; e indicam a necessidade de uma abordagem multisectorial desta doença (Hodges & Kimball, 2005). A resistência antimicrobiana é considerada uma ameaça global crescente devido à diversidade e volume de antimicrobianos prescritos em medicina humana e animal, o que facilita a selecção e dispersão de agentes patogénicos resistentes aos antimicrobianos (OMS, 2012, 2015). Por este motivo, o Centro para o Controlo de Doenças (CDC) dos E.U.A. no seu relatório de 2013, identifica *Salmonella* spp. e suas formas resistentes como uma ameaça séria à saúde global, que requer maior investigação, vigilância e monitorização (CDC, 2013). Diversos factores têm contribuído para este fenómeno que progressivamente vai afectando as alternativas terapêuticas. A prescrição muitas vezes desnecessária de antimicrobianos por parte dos médicos, a automedicação, assim como o uso abusivo destes fármacos na produção animal são as principais causas do problema. Por isso, a OMS definiu uma lista de antimicrobianos denominados criticamente importantes, que devem ser utilizados de forma prudente e preferivelmente apenas para alguns agentes patogénicos e em condições específicas (OMS, 2012, 2015, 2017; Tacconelli, *et al.*, 2018). No entanto, em função das perspectivas em relação aos factores predisponentes mencionados anteriormente, podemos reforçar a ideia da necessidade de se traçar

programas dirigidos ao controlo das infecções por salmonelas, assumindo os seus vários desafios de impacto público. Com a globalização é imprescindível o controlo da indústria de produção alimentar assegurando que os alimentos comercializados tenham a segurança microbiológica e química necessárias. Entre outros desafios importantes que a comunidade internacional deve ter em atenção, sobretudo nos países em desenvolvimento, destacam-se: a implementação de sistemas de vigilância de *Salmonella* spp. na fauna silvestre e no ambiente, que identifique o efeito da actividade antropogénica e antecipe o surgimento de novas estirpes ou serovares com potencial impacto na saúde pública; identificar e avaliar estratégias de controlo e prevenção a nível da indústria alimentar, incluindo programas de educação dos proprietários de animais e agricultores, medidas de biossegurança, vacinação e outras medidas complementares; identificar a associação causa-efeito da infecção por *Salmonella* spp. na população humana e animal, fortalecendo os sistemas de vigilância epidemiológica antes e depois de surtos ou de variações epidemiológicas significativas. Por outro lado, urge a necessidade de implementar a epidemiologia molecular como ferramenta de rotina para determinar a relação entre isolados provenientes de casos clínicos, com os provenientes de alimentos, animais e ambiente, com a finalidade de identificar as vias de transmissão mais importantes desta bactéria (Besser, 2018). Importa caracterizar, microbiológica e epidemiologicamente, os factores de virulência e determinantes de resistência das estirpes de *Salmonella* spp. com maior impacto na saúde pública e animal em cada país e por último contribuir para a melhoria no sistema de controlo e notificação dos casos clínicos e no diagnóstico etiológico, em cenários de pequenos e grandes surtos, para caracterizar o risco das distintas fontes de infecção. Estes aspetos constituem os pilares essenciais de importância global para o estudo e controlo das infecções transmitidas pelas águas e alimentos, e com particular interesse para esta Tese, infecções por *Salmonella* spp. com especial foco em serovares não tifóides invasivos que se encontram largamente disseminados em África e com expansão global (Galanis, *et al.*, 2006; Schlundt *et al.*, 2004, Kirk, *et al.*, 2015; Uche, MacLennan & Saul, 2017).

1.1.1. Generalidades sobre o género *Salmonella*

Salmonella spp.

O género *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Consiste em bactérias de coloração Gram-negativa com motilidade, em forma de bacilo, anaeróbias facultativas, maioritariamente flageladas e não esporuladas, com dimensões de 2-3 x 0.4-0.6 µm, e inclui duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (Yan, *et al.*, 2003; Pui, *et al.*, 2011). Uma terceira espécie, *Salmonella subterranea*, foi descrita por Shelobolina *et al.* (2004). Contudo, não foi reconhecida pelos centros de referência WHOCC-Salm (Grimont & Weill, 2007) e CDC.

Características culturais

As bactérias *Salmonella* spp. crescem facilmente nos meios sintéticos comuns tanto sólidos como líquidos. Nos meios líquidos como os caldos nutritivos, *Tryptic Soy Broth* (TSB) e *Brain Heart Infusion* (BHI), desenvolvem uma turbidez uniforme depois de 18-24 horas de incubação a $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Nos meios líquidos de enriquecimento como o caldo selenito ou caldo tetrationato o grau de crescimento é semelhante. Nos meios sólidos não selectivos, depois da incubação a 37°C e durante 24 horas, as colónias apresentam-se redondas, com o diâmetro de 2-3 mm, convexas, incolores, geralmente com superfície lisa, translúcidas (fases S) e raramente com superfície opaca (fase R). Em agar de sangue as colónias apresentam dimensões ligeiramente maiores em relação aos meios sólidos comuns e não apresentam hemólise. Em alguns casos existem bactérias *Salmonella* spp. de crescimento lento com diâmetro da colónia de 0.5-1 mm, e podem permanecer desta forma mesmo com incubação prolongada. Estas características são quase exclusivas de alguns serovares de *Salmonella* spp. adaptados ao hospedeiro animal (colonizadores), tais como *S. enterica* serovar Abortusequi, *S. enterica* serovar Abortusovis, entre outros, muitas vezes não causadores de infecção. A obtenção de colónias de maior dimensão pode ser conseguida adicionando ao meio de cultura tiosulfato de sódio a 0,1 % (método aplicável para a subcultura em meios não selectivos) ou por incubação por mais 24 horas. Nos meios sólidos selectivos e/ou diferenciais, por conterem substâncias inibidoras, o número de colónias formadas é inferior em pelo menos uma potência decimal, e estas apresentam diâmetro inferior e coloração diversa. No meio de *Kligler Iron Agar*, semeado

por picagem e estria, as bactérias *Salmonella* spp. crescem de forma abundante mostrando uma superfície vermelha (alcalino) e um fundo amarelo (ácido), mascarado com a formação de um precipitado negro (sulfito de ferro - reação H₂S positiva), acompanhado com bolhas de gás resultantes do processo de fermentação da glucose.

Características Bioquímicas

O típico perfil bioquímico do género *Salmonella* é evidenciado na Tabela 1.

Tabela-1. Perfil bioquímico do género *Salmonella*.

Reação	Resultado	Reacção	Resultado
Fermentação de Sacarose	-	Voges-Proskauer	-
Vermelho de metilo	+	Fermentação da Glucose (gás)	+
Redução de nitritos	+	Fermentação da Lactose	-
Produção de H ₂ S	+	Fermentação de dulcitol	+
Fermentação de maltose	-	Fermentação de Manitol	+
Fermentação de Sorbitol	+	Fermentação de Inocitol	-
Citrato de Simmons	+	Liquefacção da Gelatina	-
Fenilalanina desaminase	-	Crescimento em cianeto de potásio	-
Hidrólise de ureia	-	Orto-nitrofenil-β-galactoside	-
Lisina descarboxilase	+	Acetato	+
Ornitina descarboxilase	+	Arginina dehidrolase	+/-
Malonato	-	Indol	-

É importante realçar que a nível da espécie existem numerosas variantes possíveis do perfil bioquímico canónico do género. Para além das duas espécies major - *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, o género *Salmonella* é ainda dividido em múltiplas subespécies e serovares. Atualmente, existem mais de 2600 serovares reconhecidos e validados pelos Centros Colaborativos para Referência e Pesquisa em *Salmonella* spp. da OMS (WHOC-Salm) e a *Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases* (DFWED) do CDC, EUA, (DFWED - CDC), sendo a maioria pertencente à subespécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Grimont & Weill, 2007), e onde estão incluídos a maioria dos serovares patogénicos para o Homem (*European Center for Disease Prevention and Control* - ECDC, 2012; *European Food Safety Authority* (EFSA) & ECDC, 2017; Kurosawa, *et al.*, 2012; DFWED-CDC). Como exemplo ilustrativo

podemos salientar os 32 serovares mais prevalentes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* causadores de infecções humanas nos Estados Unidos da América (DFWED-CDC) cada serovar tem características próprias que auxiliam à sua diferenciação. A base para a identificação consiste em testes serológicos ou serotipificação. Estes são direccionados para a detecção de três grupos diferentes de antígenos presentes na superfície da bactéria (Grimont & Weill, 2007; EFSA Panel on Biological Hazards, 2010; DFWED-CDC).

O antígeno-O (antígeno somático) consiste num componente externo da parede de lipopolissacárido da bactéria. Os diferentes serovares são categorizados em grupos somáticos de acordo com os antígenos-O presentes. Inicialmente representados por letras, os grupos somáticos são hoje em dia designados pelos números dos próprios antígenos. Por exemplo, *S. enterica* ser. Typhimurium, pertence ao grupo 4, previamente designado por grupo B. O antígeno-H (antígeno flagelar) é a flagelina, o componente principal dos flagelos. A maioria dos serovares é capaz de expressar duas flagelinas (ou fases flagelares) diferentes, existindo um mecanismo genético que permite favorecer a produção de uma ou de outra e que confere à *Salmonella* spp. um carácter bifásico. Este mecanismo será novamente abordado mais adiante. No entanto, outras configurações podem ocorrer, como serovares com três ou mais fases, monofásicos e até sem nenhuma fase flagelar.

Por fim, o antígeno-Vi, é um factor de virulência relacionado com a presença de cápsula que pode ocorrer em apenas três serovares, *S. enterica* ser. Typhi (cuja designação completa é *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, serovar Typhi), *S. enterica* ser. Paratyphi tipo C (um dos agentes da febre paratifóide) e *S. enterica* ser. Dublin. A combinação dos diferentes antígenos detectados resulta numa fórmula antígenica que está associada a um determinado serovar. A fórmula apresenta primeiro os diferentes antígenos-O presentes no serovar, seguidos dos antígenos-H associados à primeira fase flagelar, e por fim os antígenos-H da segunda fase flagelar, acrescentando-se o antígeno-Vi, caso exista, como veremos em maior detalhe na secção 1.1.6.

É possível a existência de mais do que um serovar com a mesma fórmula. Nestes casos, são utilizadas outras características para distinção desses serovares, tais como variações bioquímicas, o hospedeiro de onde foi isolado e a patogenicidade, entre outras (Grimont & Weill, 2007). Mesmo dentro dos próprios serovares é possível a distinção de diferentes

estirpes com recurso a várias técnicas, como a tipificação por bacteriófagos que permite classificar estirpes em fagotipos consoante a lise ou não da bactéria quando exposta a um conjunto de vírus bacteriófagos.

1.1.2. Salmoneloses no Homem

Em humanos, a infecção por *Salmonella* pode resultar em diferentes manifestações clínicas, sendo as mais comuns a febre tifóide ou paratifóide e a gastroenterite (Coburn, Grassl & Finlay, 2007; Pui, *et al.*, 2011). A febre tifóide ou paratifóide é causada por serovares especificamente adaptados ao hospedeiro humano – Typhi e Paratyphi (Yan, *et al.*, 2003), com capacidade para atravessar a barreira intestinal e invadir as placas de Peyer. A partir das placas, estes serovares são capazes de se evadir à resposta do sistema imunitário através da colonização de células pertencentes ao sistema reticuloendotelial como os macrófagos, onde a bactéria persiste, disseminando-se por outros tecidos (Ohl & Miller, 2001; Coburn, Grassl & Finlay, 2007). Os sintomas mais comuns da doença incluem febre, mal-estar e dor abdominal, normalmente acompanhados de enxaqueca, mialgia, náusea, anorexia e obstipação. A ocorrência de diarreia está geralmente mais associada a infeções em indivíduos imunocomprometidos (Coburn, Grassl & Finlay, 2007). Existe uma probabilidade de 10% de recaída (devido à persistência nos macrófagos), complicações secundárias (incluindo encefalopatia, hemorragia gastrointestinal e perfuração intestinal) e morte (Pui, *et al.*, 2011). O tratamento primário consiste na administração de fluoroquinolonas e é eficaz na maioria dos casos, diminuindo a duração da infecção, a taxa de eliminação, a morbilidade e a mortalidade. A gastroenterite, ou salmonelose *sensu stricto*, está associada aos restantes serovares, chamados não tifóides e passíveis de infectar vários hospedeiros, como *S. enterica* ser. Typhimurium e *S. enterica* ser. Enteritidis (Yan, *et al.*, 2003; Foley & Lynne, 2008). Estes aderem ao bordo apical das células epiteliais intestinais e invadem o meio intracelular, mas geralmente não têm capacidade para continuar a migrar, resultando numa infeção autolimitante, localizada apenas a nível do tracto digestivo. Estes serovares induzem a produção de citocinas quando entram em contacto com as células do intestino, o que promove a migração de neutrófilos para o lúmen intestinal e a secreção de um exsudado rico em proteínas responsável pela diarreia líquida associada à doença (Coburn, Grassl & Finlay, 2007). A sintomatologia típica consiste em diarreia, cólicas, vômito e febre,

desaparecendo ao fim de 2 a 7 dias sem necessitar de tratamento nos casos normais (Foley & Lynne, 2008). Algumas estirpes mais agressivas podem, no entanto, causar formas mais graves da doença, com bacteriemia e infecção de outros tecidos, resultando por exemplo em meningite, pneumonia ou osteomielite (Foley & Lynne, 2008; Pui, *et al.*, 2011). Os grupos em risco de formas agravadas de salmonelose são as crianças, os idosos e os imunocomprometidos, requerendo tratamento com antibióticos caso manifestem sintomas de doença invasiva (Foley & Lynne, 2008; Pui, *et al.*, 2011). Os antimicrobianos recomendados são as fluoroquinolonas ou a cefalosporina de terceira geração ceftriaxona, no caso das crianças.

O período de excreção de *Salmonella* após infecção pode prolongar-se após resolução clínica da doença e tornar o hospedeiro um portador assintomático crónico (Pui, *et al.*, 2011), sobretudo quando o hospedeiro tem alguma alteração a nível biliar (Monack, 2012). Este fenómeno de excreção crónica é mais comum na febre tifóide, onde 1 a 4% dos convalescentes que não foram submetidos a nenhum tratamento tornam-se portadores crónicos por mais de um ano. Pode também ocorrer em infeções por serovares não tifóides, com 0,1% das infeções não tratadas resultando num período de excreção superior a um ano (Pui, *et al.*, 2011). O estatuto de portador crónico pode ter consequências importantes para a saúde pública, especialmente se a pessoa em causa trabalhar na indústria agro-alimentar, onde pode actuar como um foco de disseminação de *Salmonella* spp. (Pui, *et al.*, 2011).

1.1.3. Salmoneloses em animais

Em animais a salmonelose *sensu strictu* é a forma de doença mais comum, apesar de alguns serovares estarem associados a infeções mais severas (como *S. enterica* ser. Dublin em bovinos, *S. enterica* ser. Choleraesuis em suínos e *S. enterica* ser. Typhimurium em ratos) (Coburn, Grassl & Finlay, 2007; EFSA & ECDC, 2017). No entanto, é comum a infeção ser apenas subclínica e os animais actuarem como portadores assintomáticos, intermitentes ou crónicos, possibilitando uma rápida disseminação da bactéria através das suas fezes (EFSA & ECDC, 2017). As infeções clínicas por serovares não tifóides são geralmente desenvolvidas por animais como suínos, com idade entre as 6 e 12 semanas; enquanto animais mais velhos tornam-se portadores activos, com infeções subclínicas e excreção crónica de *Salmonella* spp. (Mastroeni *et al.*, 2009).

1.1.4. Salmoneloses e o meio ambiente

Embora os animais e os alimentos de origem animal representem as principais fontes de contaminação por *Salmonella* spp., estas bactérias também são encontradas no ambiente (água, solo, alimentos de origem vegetal) devido à contaminação através de fezes, tanto de origem humana como animal (Silva, Calva & Maloy, 2014). O meio ambiente é um reservatório excelente para muitos serovares, mesmo para aqueles que normalmente não são encontrados em animais de produção e humanos. As bactérias *Salmonella* spp. são muito comuns em águas residuais, através das quais podem espalhar-se em ambientes aquáticos como águas estagnadas, rios e lagoas, representando uma fonte de contaminação do solo, tendo como consequência directa a contaminação e infecção de vegetais para alimentação (Lemarchand & Lebaron, 2002; Monack, 2012). O uso de águas residuais para irrigação representa uma fonte directa de contaminação que é favorecida por plantas com folhagem densa, permitindo a protecção dos microrganismos da exposição a factores ambientais, como a radiação solar, temperaturas elevadas e dissecação, proporcionando uma superfície de crescimento ideal para *Salmonella* spp. (Melloul, Hassani & Rafouk, 2001). Por outro lado, os animais de pastagem promovem uma contaminação directa do solo que, através da precipitação, pode transportar contaminação para as bacias hidrográficas (Lemarchand & Lebaron, 2002; Silva, Calva & Maloy, 2014).

1.1.5. Vias de transmissão

Apesar de se apresentarem em declínio nos países ditos desenvolvidos, as infecções por *Salmonella* spp. continuam a ser uma das infeções gastrointestinais de origem alimentar mais comuns a nível mundial (OMS, 2005, 2015). A principal via de transmissão é a via fecal-oral, estando a infeção por *Salmonella* spp. vulgarmente associada ao contacto com um ambiente e produtos alimentares contaminados com fezes ou até por contacto directo com portadores animais ou humanos, sendo transmissível entre as diversas espécies animais (Hendriksen, *et al.*, 2004; Boyen *et al.*, 2008; Pui, *et al.*, 2011; EFSA & ECDC, 2017). Os principais pontos de preocupação são a contaminação de áreas de preparação de alimentos e a contaminação cruzada com matéria fecal. Na sua origem estão as más práticas de higiene, contaminação do equipamento ou dos próprios manipuladores e

processamento ou armazenamento inadequados (EFSA & ECDC, 2017; DFWED-CDC). No entanto, em países com fraco saneamento básico do meio ambiente, assim como com comercialização de alimentos de forma informal e em locais não adequados e sem segurança alimentar, é comum a transmissão cruzada entre os vários intervenientes na cadeia epidemiológica desta infecção.

Outra via descrita consiste na transmissão por via aérea. As vias aéreas superiores e os pulmões já foram previamente identificados como portas de entrada de infeções por *Salmonella* spp. (Oliveira, *et al.*, 2007). Por exemplo, a transmissão de *S. enterica* ser Typhimurium a curta distância entre leitões foi reportada (Boyen *et al.*, 2008). Esta via de transmissão parece ser serovar dependente, no entanto carece de estudos mais aprofundados (Boyen *et al.*, 2008). Uma outra via com um grande peso na prevalência de salmonelose em humanos, é a transmissão vertical de serovares não-tifóides nas aves para alimentação (Gopinath, Carden & Monack, 2012), sendo um importante problema de saúde pública devido principalmente à disseminação de *Salmonella* spp. pelos ovos, uma vez que estes são alimentos vulgarmente consumidos crus ou presentes em preparados não (ou mal) cozinhados, e uma das fontes de salmonelose humana, seguida de produtos derivados de suínos (Gantois, *et al.*, 2009; EFSA & ECDC, 2017; DFWED-CDC). Além disso, os pintos provenientes de ovos infectados com *Salmonella* spp. podem desenvolver uma infecção clínica ou tornar-se portadores assintomáticos e promover a transmissão horizontal entre o bando (Gantois, *et al.*, 2009; Gopinath, Carden & Monack, 2012). Existem duas formas de transmissão de *Salmonella* spp. ao ovo: a transmissão vertical, onde a *Salmonella* spp. penetra nos reservatórios e nas membranas internas do ovo através do contacto com as paredes dos órgãos reprodutivos de aves infectadas com *Salmonella* spp.; e a transmissão através da contaminação do ovo com fezes da ave durante ou logo após a postura do ovo (Gantois, *et al.*, 2009). A existência de transmissão mãe-filho de serovares não-tifóides noutras espécies animais encontra-se pouco estudada. Alguns autores referem que, em suínos, o estatuto de portadora de *Salmonella* spp. da porca-mãe poderá influenciar o estatuto dos leitões descendentes, sendo necessário a realização de estudos para analisar esta relação (Beloeil, *et al.*, 2004; Gebreyes, *et al.*, 2004; Nollet, *et al.*, 2005).

1.1.6. Diferentes serovares

A classificação do género *Salmonella* está baseada atualmente no esquema de White-Kaufmann-Le Minor e envolve mais de 2600 serovares de *Salmonella* identificados. Como anteriormente referido, está relacionada com a caracterização de antígenos somáticos (O) de natureza lipopolissacarídea, os flagelares (H) de natureza proteica e os capsulares ligados à virulência (Vi) (Tabela 2). Os antígenos O são resistentes ao calor e ao álcool, os antígenos Vi resistentes ao calor e os antígenos H (formados pela flagelina) são termolábeis, sendo inactivados lentamente pelo álcool e que podem existir tanto na forma simples (monomérica) ou em duas formas separadas (difásica) (Guibourdenche, *et al.*, 2010). As subespécies de *Salmonella* são divididas em serogrupos, cuja classificação é feita a partir do antígeno O. Dentro dos serogrupos existem os serovares específicos. Ainda, cada subespécie possui vários serovares e suas respectivas linhagens, onde aproximadamente 99% dos serovares mais comumente isolados pertencem à subespécie *enterica* (Grimont & Weill, 2007).

Tabela 2. Classificação de *Salmonella spp.*, em relação a espécie, subespécie e serovar pelo sistema de White-Kauffmann-Le Minor (Grimont & Weill, 2007), assim como do habitat.

Espécie e subespécie	Número de serovares	Habitat usual
<i>S. enterica</i>	2 607	Animais de sangue quente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1 586	Animais de sangue quente e ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	522	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	102	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	76	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animais de sangue frio e ambiente
Total (género <i>Salmonella</i>)	2 629	

Os nomes dos serovares de *Salmonella* evoluíram com o tempo e, actualmente, a maioria está relacionado à síndrome e/ou espécie animal mais acometida, ou ainda, à localização

geográfica. Anteriormente, eram classificados como espécies e por isso grafados em itálico. A maioria dos serovares de outras bactérias são apenas apresentados como a sua fórmula antigénica. Os serovares de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* detêm nomenclatura específica, a qual não deve ser escrita em itálico, mas sim com a primeira letra maiúscula. É ainda possível utilizar apenas o género da bactéria seguida do serovar, ficando a espécie e subespécie subentendidas (Ex: *Salmonella* serovar Typhimurium, ou *Salmonella* Typhimurium) (Grimont & Weill, 2007).

Os diversos serovares e linhagens de *Salmonella* spp. podem causar doenças sistémicas restritas em determinados hospedeiros, tais como: *S. enterica* ser. Typhi em seres humanos; *S. enterica* ser. Choleraesuis em suínos; *S. enterica* ser. Dublin em bovinos; *S. enterica* ser. Pullorum e *S. enterica* ser. Gallinarum em aves. Já outros serovares como Typhimurium e Enteritidis podem determinar doença gastrointestinal num amplo espectro de hospedeiros (Volf, *et al.*, 2012). Vários destes serovares podem também, após o aparecimento e posterior resolução da doença clínica no animal, persistir nos tecidos deste durante longos períodos, ou ainda, podem infectar o animal sem manifestação clínica caracterizando focos de contaminação assintomáticos em animais de produção (Penha Filho, *et al.*, 2010).

1.1.6.1. Diferentes linhagens clonais de *Salmonella enterica*

Em África, e em particular Angola, *Salmonella entérica* é uma das causas mais frequentes de infecção de origem alimentar. A vigilância epidemiológica deve contemplar a tipagem e a investigação da diversidade genética dos diferentes serovares de *salmonella* para entre outros aspectos, analisar o grau de homogeneidade destes serovares. O conhecimento dos diferentes clones patogénicos, a evolução da sua distribuição, incidência espacial e temporária, são subsídios importantes para o controlo da doença. É essencial também identificar os reservatórios naturais dos diferentes clones assim como as fontes de contaminação durante um determinado surto ou em casos esporádicos (Yapi K. P. *et al.*, 2016). A distribuição global e a mais difundida de *S. Typhi* baseada em MLST, é geneticamente caracterizada pelos clones ST1 e ST2 de acordo com os primeiros estudos efetuados para caracterização dos diferentes clones de *S. entérica* ser. Typhi (Kidgell *et al.* 2002; Zhang *et al.*, 2011; Dahiya *et al.*, 2013; Martínez-Gamboa *et al.*, 2015). No entanto, esta conclusão ainda é limitada devido à falta de dados sobre o aparecimento de

ST raros que podem ter circulado, mas permanecem indetetáveis, nem existe uma resposta clara para a predominância global de ST1 e ST2. É possível que essas linhas clonais ST1 e ST2 predominantes tenham alta transmissibilidade e / ou maior virulência para contornar a morte pelo sistema imune inato e provavelmente, capacidade adquirida de escapar às diferentes respostas imunes do hospedeiro, permitindo que estabeleçam um estado de portador crónico. Até à data, existem apenas alguns ST raros relatados para *S. Typhi*; estes incluem o ST8 (422mar92 do Zaire, África, 1992), que foi primeiramente reportado por Kidgell *et al.* 2002 e ST3 (SARB64, Senegal, 1988; Hangzhou-31, Hang Zhou, China) reportado por Kidgell *et al.*, 2002 e Wang *et al.*, 2009. Desde então, não há mais registos de ST8, para *S. entérica* pelo menos no banco de dados do MLST (último acesso em 10 de outubro de 2018 (Zhang *et al.*, 2011)). É provável que a população do clone ST8 tenha uma fraca disseminação e adaptação em humanos, tendo em conta a sua baixa prevalência a nível mundial, além de ser geograficamente restrita. Outras ST raras têm sido relatadas de forma intermitente, como ST890 e ST892 na China e ST1856 na Indonésia (Zhang *et al.*, 2011) e possivelmente refletem as variantes dos clones existentes. Portanto, é extremamente importante obter contribuições evolutivas completas, particularmente no que diz respeito à virulência e patogénese, sem primeiro comparar as populações actuais amplamente disseminadas com as populações aparentemente “quase extintas” nas linhas evolutivas de *S. Typhi* (Yapi K. P. *et al.*, 2016). Estudos indicam que as análises comparativas entre os genomas dos clones ST8, ST2230 e ST2359 com os genomas dos clones ST1 e ST2 poderiam ser os principais factores que sustentam as características bem-sucedidas das populações predominantes (Yapi K. P. *et al.*, 2016). Quanto a *Salmonella* não Typhi, é importante destacar os serovares Enteritidis e Typhimurium e suas variantes monofásicas que são serovares frequentemente associados a intoxicações alimentares. *Salmonella* Typhimurium, exibe uma variedade ST sendo a linhagem clonal ST19 a mais frequente e com distribuição global; enquanto a linhagem clonal ST36 tem sido frequentemente reportada na Ásia (Taiwan, Malásia, China, Tailândia) e na Europa (Reino Unido, França, Noruega). Por outro lado, as linhagens clonais ST313 e ST213 são predominantes no continente africano (Quênia, Malawi, Zimbábue, Uganda, Etiópia); estes clones, (ST313 e ST213) tinham no passado uma distribuição geográfica limitada, mas actualmente encontram-se espalhadas em vários continentes devido a factores como migração, transporte e comércio (Jain P. *et al.*,

2018). As linhagens de *Salmonella enterica* não Typhi invasivas têm um enorme impacto no continente africano, provocando infecções invasivas que, em muitos casos, resultam na morte do hospedeiro. A estimativa global de *Salmonella* não Typhi invasivas (iNTS) em 2015, foi de 3.4 milhões de casos e 681.316 mortes, sendo que a maioria destes casos ocorreram no continente africano (Crump *et al.*; 2015). Para além dos atributos de patogenicidade destes serovares, existem outros factores que ajudam na alta incidência destes clones no continente como factores ambientais (comida, água, infecções intra-hospitalares, contacto directo e indirecto, transmissão de pessoa para pessoa), e factores associados ao hospedeiro, como comorbilidades como a malária, a malnutrição em crianças e a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) em adultos e crianças, situações comuns em países africanos comparativamente a outras regiões (Feasey *et al.*, 2012). A linhagem clonal ST313, associada a estirpes de *S. enterica* ser. Typhimurium e suas variantes, é responsável por graves infecções invasivas na África sub-sahariana, e foi descrita em vários países deste continente (Moçambique, Nigéria, *etc.*) e recentemente no Brasil e Reino Unido (Mandomando *et al.*, 2015. Patchanee *et al.*, 2015. Akullian *et al.*, 2018). Curiosamente, a degradação do genoma em forma de pseudogenes e a presença de mutações de deleção têm sido observadas nesta linhagem (Kingsley *et al.*, 2009). Alguns dos genes afetados de *Salmonella* Typhimurium (ST313) estão relacionados à patogênese e outros ao metabolismo anaeróbico e entérico, mas também muito se desconhece as suas funções. A convergência entre *Salmonella* Typhimurium (ST313) e *Salmonella* Typhi levanta a possibilidade de que ST313 se tenha adaptado para ocupar um nicho único em África com uma gama de hospedeiros diferentes. A análise da Sequenciação Total do Genoma (WGS) revelou recentemente vias e mecanismos putativos de disseminação de *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Typhimurium em todo o continente africano (Wong *et al.*, 2015; Okoro *et al.*, 2012; Feasey *et al.*, 2014), e a localização de transposons em plasmídeos que codificam para resistência a múltiplos fármacos que, em algumas estirpes, fixam-se no cromossoma. Outras linhagens clonais endémicas não menos importante são a ST36 e ST11, onde ST36 tem sido identificada na China e na Tailândia fazendo assim parte da diversidade dos clones do *serovar* Typhimurium (Jain P. *et al.*, 2018) e a linhagem clonal ST11 característica de *Salmonella enterica* ser. Enteritidis com distribuição em muitas regiões do mundo (Patchanee *et al.*, 2015. Akullian *et al.*, 2018).

1.1.7. Epidemiologia global

A transmissão de *Salmonella* spp. não tifóide dos animais ao Homem através da cadeia alimentar, particularmente através de alimentos de origem animal, continua a ser um problema importante de saúde pública traduzindo-se frequentemente em infecção humana (Threlfall, 2002; Eurosurveillance Editorial Team Collective, 2006; DFWED-CDC). Existem factores que contribuem para o resurgimento e disseminação das doenças infecciosas na era dos antibióticos. Entre estes factores podemos destacar; o crescente aumento da população, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o processo de urbanização desordenado, a falta de saneamento do meio assim como a necessidade de produção de alimentos em escala industrial. Associado a todos estes factores, junta-se um deficiente controlo pelos órgãos públicos e privados de saúde pública, da qualidade dos alimentos disponíveis para consumo das populações. Tendo em conta que a principal fonte de transmissão da salmonelose é através do consumo de alimentos contaminados, a garantia da higiene dos mesmos tem como principal objectivo encontrar métodos adequados para a produção, acondicionamento e distribuição dos alimentos dentro de limites de segurança microbiológica, abrangendo não só a manipulação dos géneros alimentícios e de bebidas, mas também o emprego de utensílios e equipamentos para o seu preparo, uso de matéria-prima de boa procedência, adopção de boas práticas de higiene pessoal dos manipuladores e qualidade higiénico-sanitário da área de preparação (Ukuku, 2006). Em 1888, na Alemanha, Gurtner descreveu o primeiro surto de salmonelose, quando adoeceram 59 pessoas numa refeição conjunta e que resultou no óbito de um jovem horas depois de ter ingerido 800 gramas de carne crua (Mitakakis *et al.*, 2004). A incidência dos casos de salmonelose humana parece não estar a decrescer significativamente, apesar de todos os esforços para a redução das doenças transmitidas por alimentos (Rabsch, Tschäpe & Bäumler, 2001; Helms, Ethelberg & Mølback, 2005; DFWED-CDC). Nos Estados Unidos da América, a salmonelose constitui cerca de metade dos surtos associados a etiologia bacteriana (Lynch, *et al.*, 2006), sendo 30 a 40 mil casos de salmonelose em humanos registados anualmente pelo CDC. No entanto, estimativas apontam para que o número de casos anuais ascenda a 1,4 milhões (DFWED-CDC; Sanchez-Vargas *et al.*, 2011).

Tal como anteriormente referido, a infecção e posterior patologia decorrente do contacto com *Salmonella* spp. ocorre por transmissão fecal-oral através de água e alimentos contaminados. A grande incidência de salmonelose é encontrada em locais ou aglomerados de elevada densidade populacional e com precárias condições higiénicas, sanitárias e socio-económicas (Connor & Schwartz, 2005); embora a transmissão pessoa-pessoa possa ocorrer, particularmente nos hospitais ou, ainda, através do contacto com animais infectados, principalmente entre veterinários e trabalhadores agrícolas (Wells, *et al.*, 2001). Uma ampla variedade de alimentos pode ser contaminada com *Salmonella* spp., pois aqueles que possuem alto teor de humidade, de proteína e de carboidratos, como carne bovina, suína, aves, ovos, leite e derivados, frutos do mar e sobremesas recheadas, são mais susceptíveis à deterioração (Suresh, *et al.*, 2006; Basti, *et al.*, 2006). Outros grupos de alimentos como frutas e vegetais, minimamente processados, também podem ser veículos de salmoneloses (Ukuku, 2006; Allende, *et al.*, 2006). Em muitas regiões do mundo, a salmonelose, por não ser de notificação obrigatória, com excepção da febre tifóide, torna difícil a obtenção de dados que tenham significado estatístico (Crump, Griffin & Mintz, 2004; OMS, 2015).

Apesar da importância da epidemiologia da febre tifóide, existe uma grande subnotificação em muitos países por várias razões, incluindo o elevado número de casos da doença que não são diagnosticados, dificuldades de acesso aos serviços de saúde, não reconhecimento de casos suspeitos e uso precoce de antimicrobianos em situações clínicas indefinidas, possibilitando o surgimento de estirpes resistentes a antibióticos (Alekhun & Levy, 2007; Ajiboye *et al.*, 2009). Esta situação é comum em países subdesenvolvidos onde a falta de atenção e a fraca prestação dos cuidados da saúde fazem o dia-a-dia das populações. Os pacientes com febre entérica que se tornam portadores crónicos continuam a excretar *S. enterica* ser. Typhi nas fezes por várias semanas. Se esses pacientes não forem submetidos a um tratamento adequado, a doença pode evoluir por semanas ou até meses, podendo resultar em óbito em 10% dos acometidos em decorrência de complicações secundárias (lesões gastrointestinais), enquanto para os demais integrantes do género *Salmonella* não excede 1% (Crump, Griffin & Mintz, 2004; Mims, Playfair & Roitt, 2005). No entanto, estas taxas podem ser maiores dependendo da associação de determinados serovares com a idade dos infectados, como ocorre com a

S. enterica ser. Enteritidis em surtos com idosos em hospitais, onde a mortalidade pode atingir até 3,6% dos doentes (Shinohara, *et al.*, 2008).

Associada à falta de notificação está a existência de dificuldades no diagnóstico laboratorial do agente etiológico, o que constitui um impedimento na obtenção de informações fiáveis da vigilância epidemiológica da doença. A epidemiologia da salmonelose é dominada por apenas alguns serovares de *Salmonella* spp. não tifóide (Velge, Cloeckert & Barrow, 2005). Aqueles mais frequentemente associados com infecção humana na Europa têm sido *S. enterica* ser. Enteritidis e *S. enterica* ser. Typhimurium, correspondendo em 2004 a 76% e 14% dos casos registados, respectivamente (EFSA, 2006). Nos EUA, dados de 2004, demonstram que aproximadamente 50% dos casos humanos de salmonelose foram causados por três serovares, Typhimurium (19,2%), Enteritidis (14,1%) e Newport (9,3%) (CDC, 2005). Em 2017, os relatórios do CDC apontavam para Typhimurium (8.7%), Anatum (7.2%), Agona (4.5%), Urbana (2.5%), Newport (1%) e Infantis (0.3%), (DFWED-CDC), sendo que Enteritidis é normalmente associada a aves e a produtos avícolas, enquanto Typhimurium tem uma gama de hospedeiros mais ubíquos, sendo associada a suínos, bovinos, para além de aves e ovelhas (Threlfall, 2002; DFWED-CDC). Os relatórios da União Europeia em 2017 reportaram em oito países mais de 196 casos de *S. enterica* ser. Enteritidis confirmados e todos relacionados com o consumo de ovos contaminados (ECDC-EFSA, 2017).

Em África, dada as características transversais na cadeia epidemiológica das salmoneloses, é comum encontrar a circulação de vários serovares, com maior destaque para *S. enterica* ser. Enteritidis e *S. enterica* ser. Typhimurium, entre as mais comuns das salmoneloses, e *S. enterica* ser. Typhi, principal agente das febres entéricas. Apesar dos dados apresentados na literatura científica sobre a epidemiologia da febre tifóide no mundo, o continente africano tem sido considerado como uma região de incidência média da febre tifóide. Todavia, este facto não reflete a verdadeira dinâmica da infecção na região, uma vez que existem ainda poucos estudos epidemiológicos sobre a doença no continente (Uche, MacLennan & Saul, 2017). Estes dados epidemiológicos sobre as salmoneloses e, em particular a febre tifóide, são necessários para guiar a decisão das políticas de saúde pública para prevenção e programas de controlo da doença. As medidas tomadas por muitos países africanos têm visado alterações nas legislações na indústria

avícola, mas não têm surtido efeito no controlo dos surtos por *Salmonella* spp., que continua a ser uma das principais causas de toxinfecções alimentares em África (Uche, MacLennan & Saul, 2017). As grandes alterações ocorridas nos últimos anos na epidemiologia das salmoneloses *sensu lato*, são decorrentes de transformações associadas à criação animal, que incluem a produção intensiva e a globalização do comércio de animais e produtos alimentares, sendo importante destacar não só o aumento da incidência de determinados serovares, mas também a emergência e disseminação de estirpes resistentes a antibióticos quer em *S. enterica* ser. Typhi quer em *Salmonella* spp. não Typhi (Rabsch, Tschäpe & Bäumler, 2001; Helms, Ethelberg & Mølback, 2005; Smith, Seriki & Ajayi, 2016).

1.2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Os antibióticos são usados para tratar doenças infecciosas causadas por microrganismos patogénicos, mas existe hoje uma grande preocupação a nível da saúde pública global devido ao surgimento e disseminação de mecanismos de resistência aos antimicrobianos por parte de microrganismos patogénicos (Levy, 2000). O uso indiscriminado e a prescrição inadequada de antibióticos, assim como muitos pacientes não optarem por completar o esquema terapêutico prescrito, proporciona às populações bacterianas uma oportunidade de sobreviver e se adaptar a um ambiente com concentrações não inibitórias de antibióticos, promovendo desta forma o desenvolvimento de resistência a longo prazo (Aleksun & Levy, 2007; Pechère, *et al.*, 2007).

O sucesso de um antimicrobiano contra uma determinada bactéria é possível devido à sua toxicidade selectiva, ou seja, ser tóxico para a bactéria e não para o hospedeiro. Tal é possível graças ao facto dos antibióticos serem dirigidos às diferenças estruturais e bioquímicas existentes entre células bacterianas e as células eucarióticas do hospedeiro (Bauman, 2009). Os antibióticos podem provocar a morte da bactéria (bactericidas), ou somente causar a inibição do seu crescimento (bacteriostáticos), dependendo do seu mecanismo de acção e concentração. De uma forma geral, os antibióticos podem actuar ao nível da parede celular, membrana citoplasmática, ribossomas, DNA e metabolismo intermediário das células bacterianas (Trabulsi, 2000). As populações bacterianas sensíveis à acção do fármaco, podem tornar-se resistentes por quatro processos (**Figura 1**): alterações ao nível da parede celular e sobreexpressão de bombas de efluxo, o que permite

aumentar a sua capacidade de sobrevivência na presença do antibiótico; mutação espontânea e selecção dos mutantes no ambiente selectivo proporcionado pela presença do antibiótico; aquisição de genes de resistência transportados por veículos genéticos móveis como plasmídeos e transposões, caracterizado como transferência horizontal (Tenover, 2006). As bactérias resistentes sobrevivem ao uso do fármaco, podendo transferir esta característica às células filhas, caracterizado como transmissão vertical (Tenover, 2006). Um exemplo desse evento, ocorre no género *Salmonella*, com a selecção por quinolonas de mutações pontuais na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR, do inglês *Quinolone Resistance Determinant Region*) dos genes alvo *gyrA/B* e *parC/E*, que codificam para a DNA girase e a Topoisomerase IV, respectivamente (Wang, *et al.*, 2010). Mutações simultâneas nos genes *gyrA*, *parC* e *parE* provocam altos níveis de resistência a quinolonas em diversos serovares de *Salmonella* spp. isoladas de carnes de bovinos, aves e cordeiros comercializados na China (Yang, *et al.*, 2012). Os microrganismos exercem a sua resistência aos antimicrobianos por quatro mecanismos de resistência principais (Figura 1):

A) Destruição ou inactivação enzimática do antibiótico

Esse mecanismo é um dos mais frequentes entre bactérias Gram-negativas. Por exemplo, enzimas beta-lactamases inactivam antibióticos beta-lactâmicos, como penicilina, cefalosporinas e também carbapenemos (Tortora, Funke & Case, 2012). Estas enzimas são codificadas no cromossoma ou em elementos móveis como integroes, transposões, sequências de inserção e plasmídeos, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou ser induzidas. Devido ao grande número de bactérias resistentes, foram desenvolvidas associações de beta-lactâmicos com compostos capazes de inactivar enzimas beta-lactamases (ácido clavulanico, sulbactam, tazobactam) (de Sousa Júnior, Ferreira & Conceição, 2004).

As beta-lactamases mediadas por plasmídeos são divididas em três grupos: oxacilinasas, que hidrolisam penicilinas e oxacilinas; carbacilinasas, que hidrolisam penicilinas e carbenicilinas; e as beta-lactamases de amplo espectro (ESBL), que inactivam penicilinas e cefalosporinas de 3ª geração (Trabulsi, 2000)

B) Bloqueio da entrada do antibiótico na célula bacteriana

As bactérias podem controlar a entrada de antibióticos na célula através da presença das porinas, proteínas localizadas na membrana externa e que formam canais, regulando a entrada destes compostos. Dessa forma, a resistência é estabelecida pela célula bacteriana devido à redução da abertura das porinas, incapacitando a entrada do antibiótico no espaço periplasmático e inviabilizando a sua acção (Tortora, Funke & Case, 2012; Viveiros, *et al.*, 2007). Esse mecanismo confere resistência de baixo nível a tetraciclinas e penicilinas (Bauman, 2009).

C) Alteração do alvo do antibiótico

Por meio desse mecanismo, o alvo do antibiótico pode sofrer uma alteração que faça que a bactéria seja menos susceptível à acção do antibiótico. A acção da eritromicina, clindamicina e aminoglicosídeos é afectada por esse mecanismo. Por exemplo, a resistência aos aminoglicosídeos é maioritariamente mediada por enzimas que alteram o antibiótico.

D) Efluxo do antibiótico

O bombeamento activo de antibiótico do meio intracelular para o extracelular confere resistência a tetraciclinas, eritromicina, novobiocina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, norfloxacin, doxorubicina, e outros compostos como acriflavina, violeta de cristal, brometo de etídio, azul de metileno, rodamina 6G, Pirofosfato de tiamina, cloreto de benzalcónio, dodecilsulfato de sódio e desoxicolato de sódio (Nishino, Lafiti & Groisman, 2006). Algumas proteínas presentes na membrana plasmática das bactérias Gram-negativas agem como bombas, expulsando os antibióticos antes que estes atinjam a concentração necessária para matar a bactéria, sendo designadas por bombas de efluxo (Tenover, 2006; Viveiros, *et al.*, 2007). Existem pelo menos nove genes que codificam para bombas de efluxo no género *Salmonella*, sendo que oito deles também estão presentes em *Escherichia coli*: *acrA*, *acrD*, *acrEF*, *mdtABC*, *emrAB*, *mdfA*, *mdtK* e *macAB*. O gene *mdsABC* é exclusivo do género *Salmonella* (Nishino, Lafiti & Groisman, 2006; Quinn, *et al.*, 2006; Kumar, Mukherjee & Varela, 2013).

No caso de *Salmonella* spp., as bombas de efluxo são um obstáculo ao tratamento da salmonelose, uma vez que esses transportadores expulsam substratos estruturalmente diferentes da célula bacteriana conferindo uma defesa efectiva contra antimicrobianos e toxinas (Nishino, Lafiti & Groisman, 2006).

Evidências experimentais demonstram que após a deleção dos genes *tolC*, *acrAB* *acrD*, *acrEF*, *mdtABC*, *mdsABC*, *emrAB*, *mdfA*, *mdtK* ou *macAB* se observa um aumento da susceptibilidade das estirpes de *Salmonella* spp. aos vários antibióticos (Sun, Deng & Yan, 2014).

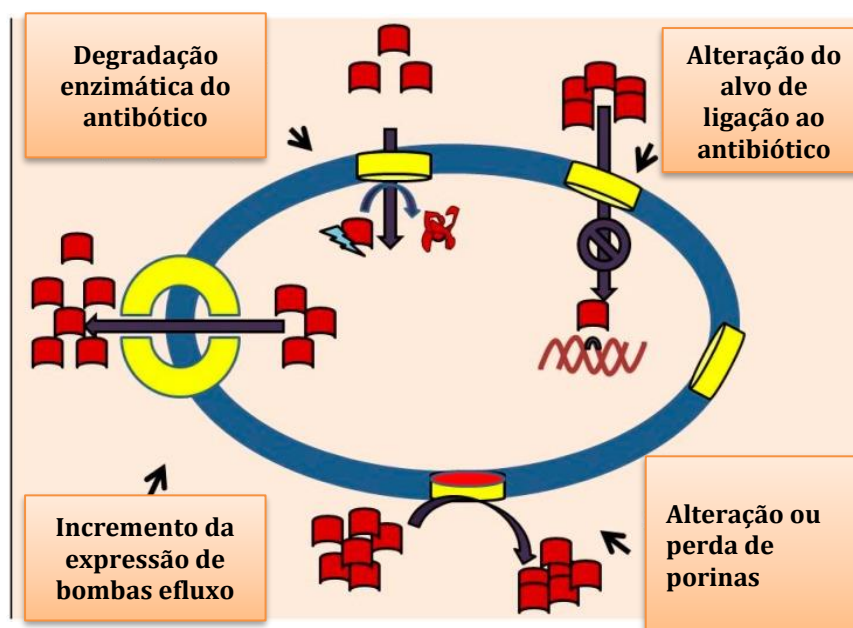


Figura 1. Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Os blocos vermelhos indicam antimicrobianos. Os canais amarelos indicam porinas. Figura adaptada de Kumar, Mukherjee & Varela, 2013.

Embora o recurso a agentes antimicrobianos para o tratamento de infeccões humanas por *Salmonella* spp. não tifóide não seja habitualmente recomendado nos casos ligeiros ou moderados, em indivíduos saudáveis, a antibioterapia deve ser iniciada nos doentes com infeccão grave e naqueles com factores de risco para infeccão extraintestinal (Hohmann, 2001). Actualmente, as fluoroquinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração são os agentes escolhidos para o tratamento de salmoneloses invasivas em adultos e crianças, respectivamente (Angulo, *et al.*, 2000; Hohmann, 2001; Pui, *et al.*, 2011). O uso de outros agentes antimicrobianos, tais como ampicilina e trimetoprim/sulfametoxazole, utilizados tradicionalmente para o tratamento destas infeccões, está limitado devido à emergência

de estirpes resistentes (Angulo, *et al.*, 2000; Hohmann, 2001). Veja-se como exemplo, um surto, descrito na Dinamarca, causado pela estirpe *S. enterica* ser. Typhimurium DT104 com resistência múltipla, incluindo às quinolonas, transmitida por suínos ao Homem, e que resultou em 25 casos, na hospitalização de 11 pessoas com desfecho fatal para duas delas (Molbak, *et al.*, 1999). Assim, verifica-se que a infeção por estirpes de *S. enterica* ser. Typhimurium resistentes às quinolonas está associada com um risco três vezes maior de doença invasiva ou morte, comparativamente com o observado com estirpes susceptíveis (Helms, Ethelberg & Mølback, 2005).

Actualmente, os genes e outros mecanismos de resistência detectados em *Salmonella* spp., não só afectam a actividade dos primeiros antibióticos a serem introduzidos no mercado (alguns ainda usados), mas também codificam para resistência a novas moléculas usadas em terapêutica humana (Fluit, 2005). Nas secções seguintes apresentam-se os genes e mutações mais frequentes em *Salmonella* spp. e associados à resistência a diferentes classes de antibióticos, salientando-se a presença de genes de resistência em vários elementos genéticos, os quais assumem particular importância na emergência e disseminação da resistência.

1.2.1. Resistência aos beta lactâmicos

A resistência aos antibióticos beta lactâmicos em *Salmonella* spp. é mediada principalmente por enzimas do tipo beta-lactamase, descritas em isolados de diversos serovares e origens geográficas (Miriagou, *et al.*, 2004; Arlet, *et al.*, 2006; Michael, *et al.*, 2006; Michael & Schwarz, 2016). Alguns dos genes detectados codificam para beta-lactamases com um espectro de actividade reduzido (ex. TEM-1, PSE-1), enquanto outras apresentam actividade hidrolítica sobre beta lactâmicos de largo espectro, como as cefalosporinas de 3ª geração, incluindo-se no grupo das ESBLs6 (como exemplo, as tipo-TEM, SHV, CTX-M, PER) ou no grupo das AmpC7 (como exemplo, as tipo-CMY, DHA, ACC-1). Mais recentemente, uma carbapenemase plasmídica do tipo KPC (KPC-2), com actividade sobre todos os beta-lactâmicos foi detectada em *Salmonella* spp. (Jure, *et al.*, 2014). Diferentes elementos genéticos estão envolvidos na mobilização e na expressão de alguns destes genes, nomeadamente sequências de inserção (IS) e integrões. Por exemplo, várias beta-lactamases do tipo CTX-M foram descritas em diferentes serovares de *Salmonella* spp., muitas delas localizadas em plasmídeos e associadas a IS

do tipo ISEcpl, responsáveis pela mobilização e expressão dos genes *bla*_{CTX-M} (Miriagou, Carattoli & Fanning, 2006). No entanto, a associação mais comum entre elementos do tipo IS e genes que codificam para beta-lactamases inclui os plasmídeos contendo *bla*_{CMY-2}, que têm emergido em vários serovares de *Salmonella* spp. nos últimos anos, em várias áreas geográficas, e que resultam da mobilização por essas IS (ex. ISECP1). As ESBL incluem as beta-lactamases da classe A do sistema de classificação de Ambler, com capacidade hidrolítica sobre as oximino-cefalosporinas (ex. cefotaxima, ceftazidima), mas não sobre as cefamicinas, e inibidas pelo ácido clavulânico e outros inibidores similares (Parry, 2003; Miriagou, *et al.*, 2004).

As beta-lactamases do tipo AmpC pertencem à classe C do sistema de classificação de Ambler; são cefalosporinases com capacidade hidrolítica sobre as cefamicinas (ex. cefoxitina) e não são inibidas pelo ácido clavulânico (Parry, 2003; Miriagou, *et al.*, 2004; Nordmann, *et al.*, 2012). Outro elemento com as mesmas funções inclui a ISCRI (orf513), inserida em integrões de classe 1 complexos, associada aos genes *bla*_{CTX-M-2}, localizados em plasmídeos, e conferindo resistência múltipla em *Salmonella* spp. na Argentina (Di Conza *et al.*, 2002; Jure, *et al.*, 2014). Adicionalmente, alguns dos genes que codificam para beta-lactamases encontram-se inseridos como cassetes em integrões de classe 1 (ex. *bla*_{OXA-1}) podendo mesmo fazer parte do *cluster* de genes na SGI1 (ex. *bla*_{PSE-1}). O integrão de classe 1 contendo o gene *bla*_{PSE-1} (também denominado *bla*_{PIb} ou *bla*_{CARB-2}), tem sido descrito fundamentalmente no clone de *S. enterica* ser. Typhimurium DT104, disseminado mundialmente (Brunelle, *et al.*, 2017), bem como em outros serovares de *Salmonella* contendo as variantes da SGI1 (Boyd, *et al.*, 2002; Mulvey, *et al.*, 2006; Brunelle, *et al.*, 2017). Também o gene *bla*_{OXA-1}/*bla*_{OXA-30} tem sido associado a um tipo de integrão de classe 1 em isolados de *Salmonella* de vários países Europeus (Xia, *et al.*, 2016; Guerra, *et al.*, 2000; Hanson, *et al.*, 2002; Lindstedt, *et al.*, 2003). Plasmídeos conjugativos do tipo IncFI, contendo o integrão *bla*_{OXA-1}-*aadA1*, juntamente com o integrão *aadB*-*catB3*, foram responsáveis pela aquisição e disseminação de resistência a múltiplos antibióticos em *Salmonella* spp, na Albânia (Akullian, *et al.*, 2018). Mais recentemente, esta estrutura tem sido localizada em plasmídeos do tipo IncFII contendo genes de virulência, para além de genes de resistência em isolados de *Salmonella* spp. de Espanha (Herrero, *et al.*, 2006; Garcia-Migura, *et al.*, 2014) e de Itália (Villa & Carattoli, 2005). A disseminação de um plasmídeo específico (do tipo InI1 e conjugativo),

associado à disseminação de uma ESBL foi também recentemente demonstrado para a *bla*_{TEM-52}, em isolados de *Salmonella* de vários serovares, de diferentes origens (aves e humanos) e países (Bélgica e França) (Cloeckaert, *et al.*, 2007; Ceyssens, *et al.*, 2015).

1.2.2. Resistência às quinolonas/fluoroquinolonas

Em *Salmonella* spp., o principal mecanismo de resistência às quinolonas decorre de mutações cromossômicas nos genes que codificam para a DNA girase (topoisomerase II), *gyrA* e *gyrB*, e para a topoisomerase IV, *parC* e *parE*, enzimas alvo das quinolonas (Hopkins, Davies & Threlfall, 2005; Giraud, Baucheron & Cloeckaert, 2006; Michael, *et al.*, 2006). Inicialmente, a resistência às quinolonas nesta bactéria foi atribuída a mutações pontuais no gene *gyrA*, sendo progressivamente detectadas estirpes com mutações duplas nesse gene e adicionalmente nos genes *gyrB* e *parE*, apresentando altos níveis de resistência a fluoroquinolonas (Hopkins, Davies & Threlfall, 2005; Velge, Cloeckaert & Barrow, 2005; Giraud, Baucheron & Cloeckaert, 2006). Geralmente, são necessárias múltiplas mutações para se atingir resistência clínica em enterobactérias (Robicsek, Jacoby & Hooper, 2006). A região QRDR do gene *gyrA* está localizada numa região do produto codificado pelo gene localizada entre os aminoácidos 67 e 106, onde habitualmente ocorrem mutações associadas com resistência às quinolonas em *S. enterica* (Hopkins, Davies & Threlfall, 2005; Velge, Cloeckaert & Barrow, 2005; Giraud, Baucheron & Cloeckaert, 2006). Também se encontram definidas as regiões QRDR onde ocorrem mutações nos genes *gyrB* e *parC* (Hopkins, Davies & Threlfall, 2005; Velge, Cloeckaert & Barrow, 2005; Giraud, Baucheron & Cloeckaert, 2006). Em *S. enterica* ser. Enteritidis, o principal serovar associado à resistência ao ácido nalidíxico, as mutações no gene *gyrA*, nomeadamente as que determinam substituições nos aminoácidos das posições 83 e/ou 87 na região QRDR8, são as mais descritas (Miko, *et al.*, 2005). Adicionalmente às múltiplas mutações nos genes acima descritos, o sistema de efluxo para múltiplos antibióticos denominado AcrAB-TolC (constituído pela bomba de efluxo AcrB na membrana citoplasmática, pela proteína acessória periplasmática AcrA que liga AcrB à proteína da membrana externa TolC) foi também considerado responsável pelos altos níveis de resistência às fluoroquinolonas em *Salmonella* (Hopkins, Davies & Threlfall, 2005; Velge, Cloeckaert & Barrow, 2005; Giraud, Baucheron & Cloeckaert, 2006; Zhang, *et al.*, 2017), nomeadamente em *S. enterica* ser. Typhimurium DT104, onde

actua sinergicamente com outras bombas, responsáveis pelo efluxo de cloranfenicol/florfenicol e tetraciclina (Baucheron, *et al.*, 2004). Mais recentemente, um mecanismo de resistência transferível foi detectado em bactérias Gram-negativas incluindo *Salmonella*, sendo o gene adquirido denominado *qnr* (de *quinolone resistance*) (Robicsek, *et al.*, 2006). As várias proteínas da família Qnr, as quais protegem a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição pelas quinolonas, são responsáveis pela resistência ao ácido nalidíxico e diminuição de susceptibilidade às fluoroquinolonas, de acordo com os *breakpoints* do *Clinical & Laboratorial Standards Institute* (CLSI) (Garcia-Migura, *et al.*, 2014). No entanto, a selecção de estirpes com mutações cromossómicas e outros mecanismos de resistência que conferem níveis mais elevados de resistência às quinolonas podem estar simultaneamente presentes na célula bacteriana (Hopkins, Davies & Threlfall, 2005; Robicsek, *et al.*, 2006). Vários genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) e suas variantes (*qnrA1* a *qnrA6*; *qnrS1* a *qnrS2* e *qnrB1* a *qnrB5*), disseminados mundialmente, foram detectadas em plasmídeos conjugativos em *Enterobacteriaceae*, incluindo em vários serovares de *Salmonella* (Gay *et al.*, 2006; Robicsek, *et al.*, 2006; Yanat, Rodríguez-Martínez & Touati, 2017). O gene *qnrB* está geralmente localizado em integções contendo a ISCR1, enquanto o gene *qnrS* não foi detectado em integções, mas associado a estruturas tipo IS (Robicsek, *et al.*, 2006). Uma variante do gene *qnrA* (*qnrA3*) foi identificada em isolados clínicos de *S. enterica* ser. Enteritidis em Hong Kong, sendo localizada em diferentes plasmídeos conjugativos que continham também o gene *bla*_{CTX-M-14}, representando um problema adicional ao conferir resistência a esses dois grupos de agentes antimicrobianos (Cheung, *et al.*, 2005). Foi ainda detectado um novo mecanismo de resistência, veiculado por plasmídeos e associado a uma nova variante do gene que codifica para a acetiltransferase AAC(6')-Ib, *aac(6)-Ib-cr*, e responsável pela diminuição de susceptibilidade à ciprofloxacina. Esta enzima é capaz de inactivar dois grupos diferentes de agentes antimicrobianos, os aminoglicosídeos (canamicina, amicacina e tobramicina) e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) (Thai, *et al.*, 2012; Maqka & Popowska, 2016; Wang, *et al.*, 2017), acrescido ao facto deste gene se localizar em isolados com resistência a diferentes grupos de antimicrobianos de grande importância clínica (Lin, *et al.*, 2015; Wang, *et al.*, 2017).

1.2.3. Resistência às tetraciclinas

Os genes *tet* detectados em *Salmonella* spp. codificam para proteínas de transporte do tipo bombas de efluxo capazes de expulsar as tetraciclinas (Michael, *et al.*, 2006). Os genes *tet(A)* e *tet(B)* são os mais frequentemente detectados entre vários serovares de *Salmonella* spp. e encontram-se normalmente associados aos transposões *Tn1721* e *Tn10*, respectivamente, que por sua vez, estão inseridos em plasmídeos que conferem resistência múltipla a outros fármacos (Michael, *et al.*, 2006). Veja-se o exemplo do gene *tet(A)*, localizado no transposão *Tn1721* e em alguns casos associado a plasmídeos conjugativos, que se encontra largamente difundido em estirpes de *Salmonella* spp. isolados de animais em Itália (Pezzella, *et al.*, 2004). Posteriormente, identificou-se uma ligação de parte do *Tn1721* com o *Tn3*, um transposão contendo o gene *bla_{TEM-1}*, promovendo a disseminação destes elementos como uma unidade, e a aquisição simultânea da resistência a duas classes de antibióticos, penicilinas e tetraciclinas (Pasquali, *et al.*, 2005). Outros genes *tet*, nomeadamente *tet(C)* e *tet(D)* associados, em alguns casos, a plasmídeos, foram também identificados em vários serovares de *Salmonella* spp. (Michael, *et al.*, 2006). Em contraste, o gene *tet(G)* parece estar restrito a isolados de *Salmonella* contendo a SGI1, nomeadamente ao clone de *S. enterica* ser. Typhimurium DT104, fazendo parte do cluster de genes de resistência múltipla identificado por Briggs & Fratamico (1999) e que ainda hoje perduram (Yanat, *et al.*, 2017).

1.2.4. Resistência aos fenicóis

Em *Salmonella* spp., os mecanismos de resistência caracterizados incluem inativação enzimática por acetiltransferases codificadas por genes do tipo A (*catA*) ou B (*catB*), para além de proteínas de efluxo específicas para cloranfenicol (gene *cmlA*) ou para cloranfenicol/florfenicol (gene *floR*) (Michael, *et al.*, 2006). Os genes *catA* (*catA1* e *catA2*) foram detectados em vários tipos de plasmídeos, enquanto os genes *catB* (*catB2*, *catB3* e *catB8*) foram localizados em cassetes de genes inseridas em integroes de classe 1 com resistência múltipla, ambos disseminados por vários serovares de *Salmonella* (Michael, *et al.*, 2006). Os genes *cmlA* descritos em *Salmonella* também fazem parte de integroes de classe 1 localizados em plasmídeos de vários serovares (Michael, *et al.*, 2006). Em contraste, o gene *floR* encontra-se principalmente como um dos componentes do cluster de genes da SGI1 (Arcangioli, *et al.*, 1999). Posteriormente, foi identificado

em plasmídeos, em diferentes serótipos de *Salmonella*, nomeadamente em plasmídeos contendo também o gene *bla_{CMY-2}* que o gene *floR* se encontrava flanqueado por regiões tipo transposase (Doublet, *et al.*, 2004). Assim, a pressão selectiva por antibióticos do grupo dos fenicóis poderá contribuir para a disseminação dos plasmídeos contendo o gene *bla_{CMY-2}* (Liebana *et al.*, 2013).

1.2.5. Resistência aos aminoglicosídeos

O mecanismo mais frequentemente associado à resistência aos aminoglicosídeos em *Salmonella* spp. é a produção de enzimas modificadoras (adicionam determinados grupos químicos à molécula do antibiótico levando à perda da sua actividade antimicrobiana) pertencentes a três classes: adeniltransferases ou nucleotiditransferases (genes *aad* ou *ant*), acetiltransferases (genes *aac*) e fosfotransferases (genes *aph*) (Michael, *et al.*, 2016; Frye & Jackson, 2013).

Em relação a adeniltransferases, foram descritos em *Salmonella* spp. os genes *aadA* [*aadA*(3'')] e *aadB* [*aadB*2'')], que conferem resistência à estreptomicina e/ou espectinomicina (Michael, *et al.*, 2006). Os genes *aadA* encontram-se largamente disseminados entre os vários serovares de *Salmonella* e localizam-se fundamentalmente em integrões de classe 1 e de classe 2. Integrões de classe 1 encontram-se geralmente associados com vários tipos de transposões, nomeadamente o *Tn21* que contém o integrão *In2*, onde a resistência à estreptomicina é codificada pelo gene *aadA1*, um dos genes mais disseminados em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Miriagou, Carattoli & Fanning, 2006; Ribeiro, *et al.*, 2011). Os integrões contendo genes *aadA* encontram-se inseridos em plasmídeos ou estão incluídos no *cluster* de genes da *SGII*, como o integrão de classe 1 contendo o gene *aadA2*. Os genes *aadB* também têm sido descritos em integrões de classe 1 contendo o gene *aadA2* ou em cassetes juntamente com outros genes de resistência (Ribeiro, *et al.*, 2011; Lindstedt, *et al.*, 2003; Randall, *et al.*, 2004) e mais recentemente numa variante da *SGII* (Vo, *et al.*, 2007; Kiss, *et al.*, 2015).

Vários tipos de genes que codificam para acetiltransferases, nomeadamente *aacC* [*aac*(3)] e [*aac*(6)], estão descritos em diversos serovares de *Salmonella*, localizados, quer em plasmídeos (Tosini, *et al.*, 1998), quer no cromossoma, incluindo em variantes da *SGII* (Michael, *et al.*, 2006; Mulvey, *et al.*, 2006). Em isolados de *Salmonella* resistentes à gentamicina e à apramicina, este último de uso exclusivo nos animais, tem

sido descrito o gene *aac(3)-IV*, que codifica para uma 3-N-acetiltransferase IV (Michael, *et al.*, 2006).

Em *Salmonella* foram identificados vários genes que codificam para fosfotransferases, normalmente localizados em elementos genéticos móveis e associados a outros genes de resistência. Em isolados de *Salmonella* resistentes à canamicina têm sido descritos os genes *aphA1* [*aph(3')-Ia*] e *aphA2* [*aph(3')-IIa*] (Guerra, *et al.*, 2004; Miko, *et al.*, 2005). Os dois genes denominados *strA* [*aph(3'')-Ib*] e *strB* [*aph(6)-Id*], que conferem resistência apenas à estreptomicina, são encontrados frequentemente ligados e associados ao gene que confere resistência às sulfonamidas, *sul2* (Michael, *et al.*, 2006). A sequência *sul2-strA-strB* foi identificada numa região de resistência múltipla localizada no cromossoma de *S. enterica* ser. Typhimurium DT193 e num plasmídeo do tipo IncI de *S. enterica* ser. Enteritidis, com uma organização genética semelhante (Daly, *et al.*, 2005). Adicionalmente, os genes *strA-strB* têm sido descritos associados a um tipo de transposição, Tn5393, incluindo a um derivado de Tn5393, caracterizado pela presença de elementos do tipo IS, típicos de um patogénico de plantas (Pezzella, *et al.*, 2004; Frye & Jackson, 2013).

1.2.6. Resistência ao trimetoprim

A resistência ao trimetoprim em *Enterobacteriaceae* ocorre fundamentalmente devido à produção de dehidrofolato redutases não inibidas pelo trimetoprim (Sköld, 2001; Michael, *et al.*, 2006). Em *Salmonella* spp., foram descritos vários genes que codificam para as dihidrofolato redutases (genes *dfr*) do tipo *dfrA*, sendo a maioria cassetes de genes localizados em integrões de classe 1 e de classe 2. O gene *dfrA1* tem sido considerado o mais disseminado entre os vários serovares de *Salmonella*, quer em integrões de classe 1 quer de classe 2 (Guerra, *et al.*, 2000; Lindstedt, *et al.*, 2003; Miko, *et al.*, 2005; Peirano, *et al.*, 2006), para além de mais recentemente ter sido identificado em variantes da SGI1, tal como o gene *dfrA10* (Michael, *et al.*, 2006; Mulvey, *et al.*, 2006). Várias cassetes de genes do tipo *dfrA* têm sido localizadas em plasmídeos (Sköld, 2001; Lindstedt, *et al.*, 2003; Miko, *et al.*, 2005), incluindo o gene *dfrA12* associado a plasmídeos com resistência múltipla de elevado peso molecular contendo integrões e genes de virulência (Guerra, *et al.*, 2001).

1.2.7. Resistência às sulfonamidas

A resistência às sulfonamidas em bactérias Gram-negativas, incluindo em *Salmonella* spp., devem-se à aquisição de um dos três genes, *sul1*, *sul2* e *sul3*, que codificam para formas de dihidropteroato sintetase não inibidas por estes agentes antimicrobianos (Sköld, 2000; Michael, *et al.*, 2006). A associação destes genes a elementos genéticos com capacidade de transferência horizontal é fundamental para facilitar a sua disseminação entre os vários serovares de *Salmonella* spp. O gene *sul1* é normalmente detectado no segmento conservado 3'CS dos integrões de classe 1, quer localizados em plasmídeos, quer na SGI1. Em contraste, o gene *sul2* encontra-se normalmente associado a outros tipos de elementos móveis, tais como plasmídeos pequenos e não conjugativos, ou de elevado peso molecular e transmissíveis (Sköld, 2000; Enne, *et al.*, 2001), que até podem conferir uma vantagem para o seu hospedeiro (Enne, *et al.*, 2004). O gene *sul3* é o gene que confere resistência às sulfonamidas mais recentemente descrito (Perreten & Boerlin, 2003), tendo sido detectado em vários isolados humanos, animais e alimentares de *E. coli* (Guerra, *et al.*, 2003; Perreten & Boerlin, 2003; Bischoff, *et al.*, 2005), nomeadamente em plasmídeos conjugativos contendo o gene *sul3* flanquado por estruturas tipo transposição (IS15 Δ /26) (Perreten & Boerlin., 2003; Frye & Jackson, 2013).

1.3. Identificação de *Salmonella* spp. em rotina microbiológica em Angola

Em Angola, o teste de aglutinação de Widal ou reacção de Widal é, em quase exclusivo, o teste padrão para o diagnóstico laboratorial de salmoneloses, sendo feito para confirmação da suspeita clínica. Este teste foi inicialmente desenvolvido por Fernand Widal em 1896 e baseia-se na utilização de suspensão de colónias de bactérias de *S. enterica* ser. Typhi e *S. enterica* ser. Paratyphi previamente tratadas com a finalidade de conter apenas os antígenos O (somático) e H (flagelar). Estes antígenos são impregnados para se detectar a presença dos respectivos anticorpos no soro do paciente suspeito de ter febre tifóide. No entanto, entre as principais causas de resultados falsos negativos, destacam-se o estado de portador, um inóculo inadequado de antígenos bacterianos para induzir a produção do anticorpo correspondente, dificuldades técnicas ou erros na execução do teste e tratamento antimicrobiano prévio à realização do teste. Entre as principais causas de falsos positivos constam a imunização prévia com antígeno de *Salmonella* spp., possibilidade de reacção cruzada com serovares de *Salmonella* não

tifóides, infecção por malária ou outras enterobactérias, além de outras doenças como a dengue. Por outro lado, a variabilidade dos antígenos e a ausência da padronização dos antígenos comerciais de *Salmonella* constituem possíveis causas tanto de falso negativo como de falso positivo.

Estão também disponíveis nalgumas unidades de saúde e no laboratório de referência nacional os métodos microbiológicos tradicionais para o tratamento, isolamento, identificação ao nível do serovar e determinação do perfil de susceptibilidade de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos. O método padrão em amostras clínicas é a cultura de fezes, que tem grande valor em estudos epidemiológicos, mas, dada a carga de trabalho, custo e volume, associado a um baixo desempenho e baixo custo-efetividade, com positividades de 1,8% a 4,4% e percentagens de recuperação de culturas em meios de MacConkey-Hektoen, entre 4% a 10% leva a que sejam técnicas muitas vezes descontinuadas nos laboratórios de rotina hospitalar tendo sido muitas vezes substituídas por identificação directa por amplificação de ácidos nucleicos específicos ou outras técnicas moleculares (Pereira & Petrechen, 2011). O isolamento e identificação de *Salmonella* spp. em uma amostra requer quatro etapas em função do tipo de amostras e características que esta apresentar.

1.3.1. Isolamento de *Salmonella* spp.

Fase de pré-enriquecimento. O objectivo desta fase é normalizar metabolicamente as células de *Salmonella* spp. É efectuado com meios de cultura não-selectivos como água peptonada ou caldo nutriente, caldo de carne lactosado ou água destilada estéril adicionada com solução de brilhante verde 0,1% e leite em pó, seguido de incubação a 37° C durante 18 a 24 horas (Andrews, *et al.*, 2014).

Fase de enriquecimento selectivo

Nesta fase, estimula-se e promove-se o crescimento de *Salmonella* spp. inibindo o crescimento de outros microorganismos presentes na flora microbiana da amostra; podem ser utilizados meios de cultura como: caldo tetracionato com sais biliares e verde brilhante de acordo com a receita de Mueller-Kauffmann ou caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) ou caldo de selino, entre outros (Rodrigues, Lázaro & Reis, 2008).

No meio selectivo caldo tetrionato com sais biliares e verde brilhante: o tetrionato inibe o crescimento de coliformes e outras bactérias intestinais, biliares; estimula o crescimento de *Salmonella* spp. e inibe a flora competitiva, o verde brilhante impede o desenvolvimento de bactérias gram-positivas da flora e carbonato de cálcio age como um tampão para manter o pH.

No caldo de Selenito cistina, o selenito inibe o crescimento da maior parte da flora intestinal competitiva (*Escherichia coli*, enterococos) sem afectar *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* e *Proteus* enquanto a cistina age favorecendo o crescimento de *Salmonella*. No meio Rappaport-Vassiliadis RV, o verde de malaquite inibe o crescimento de flora competitiva, o fosfato monopotássico e dipotássico mantêm estável o pH do meio durante o armazenamento, enquanto que o caldo enriquecido de cloreto de magnésio favorece o desenvolvimento de *Salmonella* (Andrews, *et al.*, 2014). A temperatura de incubação varia de acordo com a carga microbiana do alimento, se é muito alta, recomenda-se usar uma temperatura de 43°C e se a carga microbiana for muito baixa, usar uma temperatura de 35°C. No entanto recomenda-se usar de forma simultânea dois deles, pois diferem na sua seletividade.

Fase de crescimento e de isolamento em meios selectivos.

Esta etapa permite a diferenciação das colónias de *Salmonella* de outras bactérias, essa diferenciação está na composição dos diferentes meios de cultura que permitem o crescimento diferencial de colónias dadas as suas características. Para isolar e diferenciar colónias de *Salmonella*, os meios de cultura contêm substâncias inibidoras, tais como: antibióticos, sais biliares, desoxicolato, verde brilhante, sulfito de bismuto; os meios de cultura mais amplamente utilizados são: agar Hektoen entérico (EH), agar de desoxicolato-lisina-xilose (XLD) e o agar bismuto sulfito (BS). Nestes meios, as colónias típicas de *Salmonella* podem ser vistas da seguinte forma:

Agar bismuto Sulfito (BS): Colónias de cor castanho escuro, cinza ou pretas, às vezes com um brilho metálico; no início o meio é geralmente castanho, colónias tornam-se curvas e pretas à medida que aumenta o tempo de incubação, produzindo o chamado efeito "halo".

Em meio entérico ágar Hektoen: Colónias azuis ou verdes azuladas, com ou sem centro preto. Muitas culturas de *Salmonella* spp. podem produzir colónias quase completamente pretas ou colónias com centro preto brilhante.

Agar de desoxicolato-lisina-xilose: Colónias cor de rosa com ou sem centro preto. Muitas culturas de *Salmonella* spp. podem produzir colónias quase completamente pretas ou colónias com centro preto brilhante.

Nesta fase, as bactérias são ainda diferenciadas pela sua actividade metabólica. A identificação ou confirmação das colónias bacterianas de *Salmonella* spp. é feita mediante o uso de meios diferenciais como o agar tríplice açúcar ferro (TSI) agar lisina ferro (LIA) e, assim como provas bioquímicas complementares, tais como ureia, fermentação da galactose, crescimento em caldo KCN, produção de malonato de sódio e indol.

Os serotipos isolados de humanos e animais, pertencem na sua maioria a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* as quais têm características bioquímicas similares, o que contribui para sua identificação. No entanto, *S. enterica* ser. Typhi possui características bioquímicas únicas que se diferenciem de outros serotipos, caracterizado por um metabolismo muito lento em comparação com os outros, uma baixa produção de H₂S e reações negativas para o citrato de Simmons, ornitina descarboxilase, glicose, fermentação do dulcitol, arabinose e ramnose entre outras características

Isolamento a partir de amostras de origem humana

A procura de uma metodologia ideal para o isolamento de *Salmonella* spp. tem sido constante entre os investigadores, o que tem trazido melhorias na especificidade e na sensibilidade, bem como na simplicidade e rapidez na execução dos exames bacteriológicos para o seu isolamento e identificação.

Numerosos métodos e técnicas clássicas e moleculares têm sido descritos, visando ao isolamento de diferentes sorovares de *Salmonella* spp. procedentes de distintos locais de infecção. Nos casos clínicos, se uma amostra é obtida de forma apropriada na fase aguda da doença, não é necessária a utilização de meios de enriquecimento, dada a presença de grande número de células. Contudo, na forma crónica ou mesmo na identificação de portadores, é indicada a utilização de meios de enriquecimento e de meios seletivos para

facilitar o seu isolamento. O isolamento de salmonelas pode ser feito em simultâneo a partir de amostras de fezes, e sangue, ou ainda em outro tipo de amostras como, urina, líquido peritoneal, *etc.* Para a amostra de sangue é feita a hemocultura que segue os procedimentos comuns e não apresenta dificuldades particulares para a sua execução. Para as amostras de fezes, é utilizado o procedimento padrão de a coprocultura que pode ser complexa tendo em conta a variedade de bactérias presentes na amostra. Devido a este facto, o procedimento de diagnóstico é diferenciado; em caso de uma salmonelose aguda onde a carga bacteriana é elevada, pode se fazer uma sementeira directa da amostra para os meios selectivos e / ou diferenciais; de outra forma pode prosseguir a sementeira da amostra em meios líquidos enriquecidos contendo agentes selectivos como selenito de sódio (caldo selenito), tetracionato de sódio meio de (Muller-Kauffmam). Ver **Fluxograma 1** (secção 3.2 de Material e Métodos).

Isolamento a partir de alimentos e amostras ambientais

A pesquisa de *Salmonella* spp. nos alimentos constitui um processo de controlo exigido nos regulamentos para a segurança dos alimentos; o isolamento de salmonelas nos alimentos obedece a procedimentos padronizados e validados pela organização internacional de Normalização (ISO). O método padrão consiste em quatro fases: pré-enriquecimento, enriquecimento, isolamento, identificação e confirmação. Operacionalmente, 25 g de amostra são inoculadas em 225 ml de caldo como meio de pré-enriquecimento não selectivo (água peptonada tamponada) com subsequente homogeneização e incubação a 37°C durante 16-20 horas. Se a quantidade de amostra for inferior a 25 gramas, deve usar-se toda a amostra homogenizada o suficiente possível para efectuar uma diluição de 1:10 (v/v) de amostra. A segunda fase envolve a sementeira simultânea de 1ml de meio de pré enriquecimento em 10 ml de meio Muller- Kauffmam (caldo de enriquecimento com novobiocina) com incubação a 37°C durante 21-27 horas. Os caldos de cultura obtidos são então semeados em Agar em meios selectivos ou diferenciais como XLD e um segundo meio de escolha que pode ser o verde brilhante agar ou outro, e incubar a 37°C durante 24 horas. As colónias suspeitas de serem *Salmonella* são semeadas em agar nutriente e incubadas a 37°C por 18-24 horas para o restabelecimento de metabolismo celular; depois são submetidas a testes semelhantes aos

utilizados na busca de salmonelas em amostras clínicas. Ver **Fluxograma 2** (secção 3.2 de Material e Métodos)

1.3.2. Identificação de género

Vários métodos podem ser utilizados para a confirmação do género como *Salmonella* spp. A norma ISO 6579 de 2002 preconiza a realização de testes bioquímicos, com a possibilidade de classificação até ao nível de subespécie. Com o objectivo de diminuir o tempo necessário para o diagnóstico em comparação com os métodos convencionais, vários investigadores (Malorny, *et al.*, 2003; Salehi, Mahzounieh & Saeedzadeh, 2005; Kim & Bhunia, 2008; Levin, 2009) estudaram diversas técnicas, tais como novos meios seletivos, protocolos de isolamento diferentes, e vários protocolos de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e Ensaio Imunoadsorvente Associado a Enzima (ELISA), entre outros. Um dos métodos mais utilizado e mais facilmente aplicado consiste na deteção do gene *invA*. O gene *invA* é um gene de virulência que codifica uma proteína essencial para a invasão das células epiteliais do intestino, encontrando-se presente na larga maioria dos isolados de diferentes serovares de *Salmonella* spp (Bulte & Jakob, 1995). Um estudo interlaboratorial efectuado por Malorny *et al.*, determinou o gene *invA* como sendo o mais específico na distinção entre *Salmonella* e outros géneros comparativamente a outros genes de virulência também utilizados (Malorny *et al.*, 2003). Contudo, os métodos de biologia molecular apenas dão uma identificação presuntiva pelo que exigem um passo de confirmação. Durante a fase de diagnóstico laboratorial confirmatório, testes bioquímicos tradicionais, tais como o crescimento em agar de Kliger com ferro ou agar com três açúcares e ferro seguido de teste de aglutinação em lâmina de látex com os anti-soros. A sementeira de agar de Kliger, em plano inclinado, permite uma primeira orientação sobre a produção de gás de H₂S, e a fermentação da glucose e lactose. De acordo com o “*Manual de Clinical Microbiology da ASM*” cerca de vinte e oito testes que permitem a identificação ao nível de família e, em alguns casos, até mesmo as espécies tais como os testes de urease, o teste de Voges-Proskauer, a motilidade para além do já descritos, bem como o teste de fermentação de hidratos de carbono, os testes de hidrólise pomarnitrofenilgalattopiranoside (ONPG) (Jorgesen *et al.*, 2015). Esta bateria de testes bioquímicos está condensada em três métodos bioquímicos manuais-Enterotube,

Api 20E e Minitek e sistemas automatizados como o Vitek (bioMérieux, França) ou o Phoenix (Becton & Dickinson, EUA).

1.3.3. Identificação de serovar

A serotipificação constitui uma importante ferramenta epidemiológica complementar na identificação de *Salmonella* spp., permitindo determinar a prevalência/emergência ou apontar tendências de um serovar em distintas zonas geográficas, bem como identificar surtos, conhecer as fontes de infecção e vias de transmissão. A distribuição dos serovares estão catalogadas no esquema de Kauffmann e White (Grimont & Weill, 2007; DFWED-CDC) e envolve a identificação dos antígenos somáticos e flagelares. Baseado nos componentes antígenicos somáticos O e flagelares H, foi estabelecido o esquema denominado Kauffmann-White, que contém informações quanto às espécies, subespécies e apresenta listadas as fórmulas antigênicas de todos os serovares, por exemplo, na primeira coluna a estrutura somática, cujos serovares que possuem tais características são identificados por letras maiúsculas. Ex.: grupo A (O:2), grupo B (O:4), grupo C1 (O:6,7), grupo C2 (O:6,8,20), grupo D1 (O:9), grupo E1 (O:3,10), grupo E2 (O:3,15), grupo E4 (O:1,3,19), etc. As estruturas flagelares, indicadas por letras minúsculas e números, fase 1, e a fase 2, representadas por números arábicos, além de letras minúsculas. Quanto aos antígenos O e H, alguns aspectos devem ser considerados:

1. Antígeno O de *Salmonella* spp. : O grupo antígeno é identificado por alguns factores, como: O:4, O:9. Outros têm pouco ou nenhum valor discriminatório e apresentam-se normalmente associados, por exemplo: O:12, com O:2, O:4 e O:9; *S. Paratyphi* A (O:1,2,12), *S. Typhimurium* (O:1,4,5,12) e *S. Enteritidis* (O:1,9,12).

Determinados antígenos surgem como consequência de uma modificação da estrutura, por exemplo: O:1 resulta da inserção de uma cadeia de galactose no polissacárideo e O:5, de uma reacção de acetilação presente nas unidades repetidas do polissacárideo, responsável pela especificidade, por exemplo: O:4,12 como é o caso do serovar *S. Typhimurium* O:1,4,5,12.

2. Antígenos H de *Salmonella* spp.: Os factores antígenicos H de *Salmonella* são representados por letras minúsculas nas fases específicas (H1), como “i” em *S. Typhimurium* e “z10” em *S. Hadar*, ou associadas, q, m, f, g, h, etc. A outra fase, definida como não específica ou H2, e representada por números arábicos, como 1,2; 1,5; 1,6; 1,7, além de letras minúsculas e.n, x, z4, z6, etc.

1.3.4. Genotipagem por PFGE e MLST

A utilização de métodos moleculares para genotipagem permite, através da comparação de padrões de amplificação ou digestão de Ácido desoxirribonucleico (DNA), compreender se os isolados de *Salmonella* spp. podem ser derivados do mesmo clone. Entre as técnicas mais comuns estão a análise dos perfis de plasmídeos, a análise do Ácido ribonucleico (RNA) ribossomal, AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfism*) e VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*). A técnica de tipagem de ADN (ou *DNA fingerprinting*) pela técnica de PFGE (Eletroforese em gel de campo pulsado – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*). O DNA é fragmentado por enzimas endonucleases de restrição e, em seguida, o produto da digestão é corrido ao longo de um gel de agarose sujeito a um campo eléctrico pulsado, para separar os fragmentos originados e medir o seu número e tamanho. É obtido um perfil de restrição enzimática único para cada clone, consistindo em bandas individuais destacadas por fluorescência através da coloração com brometo de etídio, por exemplo. Este perfil de restrição permite a tipificação inequívoca da estirpe examinada e comparação com os perfis obtidos a partir de outras estirpes da mesma espécie. Quando se pretende separar fragmentos de ADN acima de 30 Kb, deve-se usar electroforese em gel de campo (PFGE). Uma técnica inventada por Schwartz e Cantor em 1983 que utiliza dois campos eléctricos com campos diferentes, que são aplicados de forma alterna para o interior do gel de agarose por períodos de tempo definidos, na ordem de segundos. A acção do primeiro campo provoca um alongamento ao longo do plano horizontal das moléculas de DNA assim como orienta o seu movimento no gel. A interrupção deste campo e a acção do segundo faz com que as moléculas se movam em nova direcção. As moléculas mais pequenas alinham-se mais rápido no novo campo eléctrico pulsado e movem-se mais rapidamente através do gel. As moléculas de DNA maiores, ao contrário, levam mais tempo para se alinharem e esta diferença de comportamentos permite uma melhor separação de fragmentos de tamanhos muito diversos que vão da ordem de milhares de Kb a 0,1 Kb.

O PFGE permite separar fragmentos de DNA até 10 Mb. Considerado o método padrão das técnicas de diferenciação molecular de *Salmonella* (Levin, 2009; Wattiau, Boland & Bertrand, 2011), o PFGE é uma técnica com alto poder discriminatório permitindo obter um perfil de restrição do DNA bacteriano e comparar os diferentes perfis dos isolados

para avaliar-se a clonalidade (Tenover, *et al.*, 1995). Ao longo dos anos, vários métodos e critérios foram desenvolvidos para classificar os perfis e determinar qual o seu grau de semelhança (Tenover, *et al.*, 1995; McDougal, *et al.*, 2003; Carriço, *et al.*, 2005). Perfis com seis ou menos bandas de diferença (Tenover, *et al.*, 1995) ou 80% de semelhança entre si (Carriço, *et al.*, 2005) são considerados da mesma linhagem genética, e, portanto, parte do mesmo grupo clonal. Dentro do grupo clonal podem estar presentes clones derivados do mesmo evento epidemiológico; estes clones apresentam um grau de semelhança mais elevado, com apenas três ou menos bandas de diferença (Levin, 2009; Wattiau, Boland & Bertrand, 2011). Uma rede internacional, a “PulseNet”, foi desenvolvida com o fim de harmonizar a metodologia entre diferentes laboratórios e possibilitar a partilha de dados e a comparação entre perfis de vários géneros microbianos, incluindo *Salmonella* (Hunter, *et al.*, 2005; Gatto, *et al.*, 2006; Boxrud, *et al.*, 2010; Lucarelli, *et al.*, 2010).

A tipagem de sequência *multilocus*, ou MLST (*MultiLocus Sequence Typing*), consiste na amplificação de fragmentos de nucleótidos internos de 7 genes estruturais e comparação das sequências obtidas com todas as sequências previamente identificadas, como identificação dos alelos para cada *locus*. A combinação numérica dos 7 alelos forma a sequência tipo (“*sequence type*”, ST), e é utilizada no estudo da clonalidade e da divergência genética entre diferentes estirpes (Aanensen & Spratt, 2005).

O primeiro esquema desenvolvido para *Salmonella* spp. teve como objectivo o estudo comparativo de *S. enterica* ser. Typhi com os serovares não-tifóides (Kidgell, *et al.*, 2002). Apesar de não ter tido sucesso em diferenciar os isolados de *S. enterica* ser. Typhi entre si (Kidgell *et al.*, 2002), a discriminação entre os serovares não-tifóides foi satisfatória, e este protocolo continua a ser o mais utilizado hoje em dia (Wattiau, Boland & Bertrand, 2011), com uma base de dados acessível online (<http://mlst.ucc.ie/mlst>).

1.3.5. Tipificação por bacteriófagos

A fagotipagem torna possível diferenciar os vários serovares em subtipos de acordo com a diferente sensibilidade contra um painel de bacteriófagos. Esta técnica explora as características que algumas bactérias possuem ao terem receptores específicos para determinados fagos específicos, que podem penetrar, replicar-se na célula e induzir a lise. O modo de execução e interpretação da técnica é baseado em diferentes esquemas, mas

aqueles mais comumente usados são as indicadas pelo *Phage-typing Reference Laboratory* (Health Protection Agency, London, UK, Anderson, *et al.*, 1977). É definitivamente um método muito útil, mas com a desvantagem de depender muito da capacidade do técnico para interpretação, por conseguinte também difícil de padronizar. Além disso, os reagentes não estão comercialmente disponíveis, e apenas os laboratórios nacionais de referência têm condições para realizar a fagotipagem. Operacionalmente, os isolados são semeados em placas de Agar de Soja Triptycase (TSA) e incubadas a 37°C por 18-24 horas. De forma sucessiva e com uma ansa de platina bacteriana são transferidos em 4ml de Caldo Nutriente 2X (DIFCO) e incubadas a 37°C durante 18-24 horas. Simultaneamente são transferidos os fagos adequadamente diluídos em microplacas. As culturas em caldo são semeadas em placas de Ágar Nutriente, para o qual os fagos são adicionados de modo a formar gotas bem demarcadas. As placas inoculadas são incubadas a 37° C durante 18-24 horas. No final da incubação é feita a leitura. A presença da lise com o fago correspondente é evidenciada pela formação de uma placa circular em que a patina bacteriana está ausente, ou pela presença de placas de número e tamanho variáveis em caso de uma lise incompleta. A leitura e a interpretação dos resultados é feita segundo o esquema proposto pela *international Phage-typing Reference Laboratory* (Health Protection Agency, London, UK).

1.3.6. Caracterização de plasmídeos

Os plasmídeos são elementos móveis de dupla cadeia de DNA de tamanho variável e de replicação autónoma do DNA cromossômico bacteriano (Turner, Cooper & Lenski, 1998; Carattoli, 2005). Para além da transmissão horizontal entre bactérias de diferentes clones e até diferentes espécies, através de conjugação bacteriana (Boyd & Hartl, 1997; Carattoli, 2009), a transmissão vertical de plasmídeos também é possível, conferindo aos descendentes o mesmo conteúdo plasmídico que a bactéria original (Millemann, *et al.*, 1995; Carattoli, 2009). Esta facilidade de transmissão, combinada com a integração de outros elementos móveis nos próprios plasmídeos, torna-os uma das principais formas de propagação de diferentes genes de virulência e resistência a antibióticos, possibilitando a adaptação das bactérias a ambientes hostis (Carattoli, 2003; Carattoli, 2009; Anjum, *et al.*, 2011). O estudo do perfil e características dos plasmídeos presentes nas estirpes microbianas permitem estabelecer a comparação entre diferentes isolados (Tannock, *et*

al., 1990) e de determinação da relação entre isolados, em conjunção com outras técnicas (Hauser *et al.*, 2010; Ido *et al.*, 2011). Vários parâmetros são utilizados na caracterização de plasmídeos, como o tamanho, os genes de virulência ou de antibiorresistência inseridos no plasmídeo e os genes de controlo da replicação. No entanto, apenas o estudo dos genes de controlo da replicação permite uma classificação formal dos plasmídeos, dado que fazem parte da estrutura necessária para uma replicação bem-sucedida e, portanto, constituindo-se como os genes mais estáveis do plasmídeo (Carattoli, 2009). A identificação dos genes de controlo da replicação é feita com base em testes de incompatibilidade – dois plasmídeos com os mesmos genes de controlo de replicação não se conseguem propagar de forma estável na mesma célula, pelo que, durante a conjugação de duas bactérias, apenas o plasmídeo previamente presente se mantém na bactéria recetora (Carattoli, 2009). Hoje em dia, a caracterização plasmídica consiste na amplificação por PCR da região de replicação pelo esquema desenvolvido por (Carattoli *et al.*, 2005), optimizado para a deteção dos principais replicões. Ainda assim, o melhor método de estudo dos plasmídeos é a sua sequenciação total, que permite a identificação de novas famílias de plasmídeos (Carattoli, 2009). A presença de plasmídeos nas diferentes estirpes de *Salmonella* é variável, com a detecção de grandes plasmídeos (acima de 90 kb) de virulência e resistência nalgumas estirpes, assim como a ausência total destes elementos genéticos noutras (Switt, *et al.*, 2009; Anjum, *et al.*, 2011)

1.4. Patogénese e Tratamento

Como anteriormente referido *Salmonella* spp. são bactérias que causam infecção e doença em humanos e animais, através do consumo e da ingestão de alimentos contaminados. As espécies desse género atravessam a camada epitelial do intestino, alcançam a lâmina própria (camada de células conjuntivas na qual as células epiteliais estão ancoradas), onde proliferam. São fagocitadas pelos monócitos e macrófagos, resultando numa resposta inflamatória, decorrente da hiperatividade do sistema reticuloendotelial. Ao contrário do que ocorre na febre tifóide, nas enterocolites, a penetração de *Salmonella* spp. fica limitada à lâmina própria. Nestes casos, raramente se observa septicemia ou infecção sistémica, ficando a infecção restrita à mucosa intestinal. A resposta inflamatória está relacionada também com a libertação de prostaglandinas, que são estimuladoras de adenilciclase, o que resulta num aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando

diarréia aquosa (Haimovich *et al.*, 2006; Mims *et al.*, 2005). O serovar predominante causador de infecções alimentares mudou nas últimas décadas de Agona, Hadar e Typhimurium para Enteritidis, sendo este serovar a causa predominante de salmoneloses em diversos países (Suresh *et al.*, 2006; DFWED-CDC). Alterações nos serovares refletem mudanças na produção animal e a disseminação de novos serovares devido ao grande fluxo do comércio mundial. A principal grande preocupação na actualidade é o aparecimento de serovares do género *Salmonella* multirresistentes a antibióticos (D'Aoust, 1994; Suresh, *et al.*, 2006, DFWED-CDC).

Um grande número de bactérias *Salmonella* precisa ser ingerido para que ocorra gastroenterite; normalmente a dose infectante depende do serovar isolado (entre $2,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^6$) (Huang, 1999); também ocorre variação quanto ao alimento e à estirpe envolvida. Entretanto, algumas vezes, a doença pode ser fatal em crianças, idosos ou imunocomprometidos, devido à menor resistência às infecções (Mims, *et al.*, 2005). O tratamento com antibacterianos deve ser iniciado logo seja diagnosticada a febre tifóide ou a febre entérica e o tratamento deve ser mantido pelo menos uma semana após a temperatura ter voltado ao normal, para que possa atingir a *Salmonella* na sua localização intracelular, concretamente na lâmina própria após atravessarem a camada epitelial intestinal (Mims *et al.*, 2005). Antes do advento dos antibióticos, a taxa de mortalidade era de 10 a 15%; com a terapia à base de antibióticos, essa taxa foi reduzida para menos de 1% (Jawetz & Adelberg, 2006). Tal como já foi referido, com exceção da *S. enterica* ser. Typhi e *S. enterica* ser. Paratyphi, as outras salmonellas geralmente apresentam quadro clínico autolimitante com reversão espontânea em 48 horas, e a administração de antibióticos no tratamento das gastroenterites não é recomendado, pois prolonga o período de excreção do agente, caracterizando o portador assintomático, além de promover o aparecimento de salmonelas multirresistentes (Suresh, *et al.* 2006).

1.5. Epidemiologia da Samonelose em África e no contexto do sistema nacional de saúde em Angola

1.5.1. Epidemiologia da Samonelose em África

A rede sanitária de muitos países do continente africano apresenta ainda debilidades estruturais, associada à ausência de políticas e programas adequados para o controlo de muitas doenças transmissíveis, entre estas a febre tifóide. A ausência e/ou debilidades do

saneamento do meio, a falta de água potável, a pobreza assim como a fraca educação da população para as questões da saúde contribui significativamente para a morbidade e mortalidade das infecções por *Salmonella* spp. A organização mundial da saúde (OMS) estima que a região Africana possui a mais alta incidência de doenças transmitidas por alimentos; estima-se que mais de 91 milhões de pessoas são infectados e destes 137.000 morrem anualmente (OMS, 2015). As doenças diarreicas são responsáveis por 70% de casos de doenças por contaminação alimentar; a salmonelose não tifóide provoca o maior número de mortes sendo responsável por 32.000 óbitos por ano nesta região, mais da metade dos casos de morte global por doenças de transmissão alimentar (OMS, 2015). Em África a febre tifóide ainda não foi estudada e acompanhada como noutras regiões do mundo. Este facto deve-se em grande medida aos poucos recursos destinados para o diagnóstico laboratorial assim como as insuficientes infraestruturas para apoiar estudos clínicos e epidemiológicos. Estes problemas constituem manifestações dos grandes desafios de um continente empobrecido com elevada co-infecção por Vírus de Imunodeficiência Humana (VIH) e governos instáveis, assim como com outras prioridades de cuidados de saúde primários a sobreporem-se às capacidades dos países em fornecer alimentos com segurança e água potável. Em África o acesso a água potável deve ser compreendido como o acesso a água de pipas de camiões ou de poços porque as estações de tratamento de água e o saneamento e distribuição de água potável estão na sua maioria obsoletos e em muitos casos não funcionam devidamente. Em África, é difícil analisar a estimativa real da incidência da febre tifóide, por motivos vários que vão desde a ausência ou falta de fiabilidade dos dados de vigilância epidemiológica, clínica e laboratorial, assim como grande variação demográfica em todas as regiões. (Crump, Luby & Mintz, 2004). A comparação de dados de vigilância entre Quênia e África do Sul, por exemplo, mostram variações na demografia dos pacientes com febre tifóide. A febre tifóide na África do Sul é uma doença prevalente principalmente em crianças entre 5-15 anos de idade; enquanto que nas áreas urbanas do Quênia (onde a incidência da febre tifóide é alta com 247 casos por 100.000) a doença é registada predominantemente em crianças menores de 10 anos, e a incidência em área urbana é 15 vezes maior do que a encontrada na área rural em Quênia. Em contraste no Gana a doença parece ser mais comum em crianças menores de 5 anos e no Moshi, Tanzânia, a febre tifóide é

diagnosticada quer em adultos quer em crianças. (Crump, Luby & Mintz, 2004; Uche, MacLennan & Saul, 2017).

Em muitos países Africanos onde a situação não está controlada são reportados poucos dados para omitir a existência de um problema de saúde pública. Um dos factores problemáticos para estimar o peso da febre tifóide é o aumento do número de casos de salmonelose não Typhi invasiva e, por conseguinte, uma doença fatal em África, o que passou a ser um enorme fator de confusão quando não existem dados laboratoriais para diferenciar *S. enterica* ser. Typhi de *S. enterica* não Typhi (Mweu & English, 2008; Graham, *et al.*, 2000; Uche, MacLennan & Saul, 2017)

A falta de tecnologia apropriada para a realização da serotipagem das *Salmonella spp*, assim como para diferenciar *S. enterica* ser. Typhi ou *S. enterica* ser. Paratyphi A das outras infecções por *S. enterica* não typhi, fazem com que as taxas desta infecção não representem a verdadeira incidência da febre tifóide no continente (Susan, *et al.*, 2009; Uche, MacLennan & Saul, 2017). Consequentemente, a ausência destes dados tem implicações nas estratégias de saúde pública para o controlo da febre tifóide e outras salmoneloses sendo as intervenções de saúde pública diferentes para a febre tifóide e para salmoneloses invasivas não tifóide.

Uma das grandes preocupações de controlar a febre tifóide em África assim como em outras regiões tem a ver com a emergência e disseminação de estirpes resistentes. O método de cultura continua a ser o preferencial para a confirmação da febre tifóide e outras salmoneloses, permitindo obter informações sobre a circulação da resistência aos antimicrobianos quando o antibiograma é efectuado em rotina. No entanto, em situações de surtos epidémicos os testes rápidos, embora não sejam os ideais, são mais usados do que o método de cultura, para definir a expansão da epidemia, perdendo-se a informação sobre a resistência.

Assim, o diagnóstico e a gestão da saúde pública dos casos de febre tifóide em África são afectados por vários desafios, incluindo a fraca vigilância epidemiológica e consequentemente ausência de dados epidemiológicos assim como pelas debilidades de diagnóstico laboratorial, pelo inadequado fornecimento de água potável, pela sanidade do meio, assim como pelo uso inadequado e sem controlo de antibióticos de onde resulta o rápido surgimento de resistência aos antimicrobianos, entre outros factores (Crump, Luby & Mintz, 2004; Uche, MacLennan & Saul, 2017). Em resumo, em África pouco ainda se

conhece sobre a febre tifóide e as restantes salmoneloses. Esforços concertados em providenciar alimentos com segurança e qualidade de água assim como a vacinação poderão ajudar ao controlo da febre tifóide em África mas sobretudo há que realizar estudos de caracterização, microbiológica, genético-molecular e epidemiológicos, para determinar os factores de virulência e determinantes de resistência nas estirpes de *Salmonella* spp. com maior impacto na saúde pública e animal em África, assim como assegurar a melhoria no sistema de notificação de casos clínicos e no diagnóstico etiológico do agente, para caracterizar precocemente o risco de distintas fontes de infecção.

1.5.2. **Epidemiologia da Samonelose no contexto do sistema nacional de saúde de Angola (SNS)**

Embora não exista um banco de dados a respeito da frequência de surtos de febres entéricas (tifóide e paratifóide) assim como outras salmoneloses em Angola, é possível relatar situações de emergências sanitárias com o envolvimento de serovares de *Salmonella* spp. Fazendo uma retrospectiva da história mais recente de ocorrência de surtos por *Salmonella* spp. em Angola temos: a) em 1978, três anos após a independência nacional ocorreu um surto de febre tifóide na cidade do Uíge província com o mesmo nome, o surto foi atribuído como sendo febre tifóide em função das manifestações clínicas e por alguns testes realizados no laboratório; estima-se que entre 100 a 150 pessoas teriam sido infectadas; b) após a epidemia de Marburg em 2005, a província do Uíge voltou a ser assolada por um surto de casos de febre tifóide com registo de 27 casos e 14 óbitos ou seja 50% das pessoas infectadas; c) em 2015 com o aumento de número de casos em quase todo o país, a Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto organizou um Workshop sobre “Febre tifóide – Visão Global do Problema”, onde foram elucidados os erros de diagnóstico da febre tifóide na nossa rede sanitária.

Angola por ser um país endémico, os casos de febre tifóide e outras salmoneloses nunca deixaram de existir se considerarmos os factores de risco presentes para a morbilidade da doença. Sem estarem ainda definidos os mecanismos ou programas para controlo e contenção da doença, temos um longo caminho a percorrer a julgar das condições predisponíveis para a morbilidade da doença. O controlo da salmonelose em Angola passa por uma redefinição de políticas de controlo das doenças transmissíveis, abrangente a

todos os sectores, adequando as infra-estruturas de apoio com recursos humanos capazes e suficientes, e estabelecendo uma política de comunicação que visa promover a educação sanitária a todos os níveis. A constante presença de factores de risco como os ambientais (alimentos e água), os relacionados com o estado do hospedeiro (idade, má nutrição, anemia, malária, VIH), os relacionados com a infecção hospitalar (contaminação alimentar, infecção de pessoa a pessoa) assim como os relacionados com a transmissão zoonótica e a transmissão de homem para homem, todos associados ao fraco saneamento do meio, constituem, sem dúvida, elementos chave para a morbilidade e mortalidade da doença nas suas formas clínicas, febre tifóide, febres entéricas e outras salmoneloses *sensu latu*.

No presente contexto angolano, torna-se difícil fazer uma estimativa da percentagem de isolados de *Salmonella* spp. devido a ausência quase geral dos serviços de suporte laboratorial para o isolamento e caracterização das estirpes de *Salmonella* spp., dificultando desta forma as estimativas de prevalência de casos de febre tifóide e de outras salmoneloses no país.

Sabe-se no entanto que o Programa de Vigilância integrada de Doenças (PVID) do Ministério da Saúde de Angola, recebe notificações de ocorrência de casos de salmonelose das diferentes regiões do país. Esta notificação é baseada principalmente e quase exclusivamente em considerações clínicas e no teste de Widal que é usado para o diagnóstico de *S. enterica* ser. Typhi, agente causador da febre tifóide, aumentando desta forma o número de falsos positivos e negativos no que se refere a *S. enterica* ser. Typhi; por outro lado este facto, aumenta a incerteza sobre a verdadeira dinâmica de circulação e prevalência dos diferentes serovares. A real prevalência da salmonelose não é conhecida, apesar de se tratar de uma doença de notificação obrigatória, nem sempre os surtos são notificados às autoridades sanitárias, e isso ocorre devido ao facto de que a maioria dos casos de gastroenterites ocorrem sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado. Por outro lado, pelo fraco sistema de notificação, falta de estruturas de apoio ao diagnóstico clínico e epidemiológico assim como pela ausência de programas direccionados para o controlo da doença entre outros factores esta patologia tem sido sistematicamente negligenciada pelo sistema de saúde. Nos últimos 4 anos, segundo dados do Centro de Processamento de Dados Epidemiológicos (CPDE) da Direcção Nacional de saúde Pública, foram notificados mais

de 1.264.070 casos suspeitos de febre tifóide em todo país com registo de 1.103 óbitos (Tabela3). Destes dados destacam-se as Províncias de Benguela com 383.843 (30.36 %) casos com uma média anual de 95.960 casos, seguida pela região de Luanda com 337.272 (26.68%) casos, com uma média anual de 84.318 casos e a província do Huambo com 89.313 (7.06%) casos com uma média anual de 22.328 casos. Estes dados espelham por si a situação prevalente sobre as infecções por *Salmonella* spp. no país, indicando por um lado a alta morbilidade de estirpes de *Salmonella* no nosso meio e por outro lado a necessidade de uma abordagem diferente que permita o controlo da infecção em todas as vertentes quer clínica, laboratorial, epidemiológica e a monitorização de resistência aos antimicrobianos através do tratamento dos pacientes infectados alinhada a uma política de investigação científica e epidemiológica mais profunda sobre os vários factores biológicos, genéticos e sociais para uma melhor abordagem e compreensão do fenómeno das infecções por *Salmonella* spp. em Angola.

Tabela 3. Resumo de casos de febre tifóide 2013-2016 em Angola

Anos	2013		2014		2015		2016	
Províncias	casos	óbitos	casos	óbitos	casos	óbitos	casos	Óbitos
Bengo	8891	1	10520	5	17604	4	14179	6
Benguela	61880	97	98434	53	137012	124	90517	92
Bié	9039	44	15409	12	14190	20	15878	21
Cabinda	2838	0	2151	0	3214	0	4601	0
Cunene	5691	0	1612	9	1840	13	1191	10
Huambo	19738	3	17884	14	28455	7	23236	14
Huila	8089	4	13961	5	14729	3	11099	5
K.Kubango	353	0	628	2	1479	0	1071	0
K. Norte	2233	0	1567	0	1763	0	2456	0
K. Sul	9202	26	21676	22	13393	16	10170	38
Luanda	82421	30	88586	16	86907	11	79358	167
L. Norte	2687	5	2896	0	6018	13	4387	0
L. Sul	2938	5	5948	5	4830	2	3566	0
Moxico	10864	0	14684	4	17567	5	25685	14
Malanje	1972	5	959	0	1577	0	2684	10
Namibe	1371	7	3318	2	4291	2	3156	1
Uíge	3769	9	5538	7	5917	15	7279	22
Zaire	15203	2	18405	2	18038	1	11374	71
Total	249.179	238	324.176	158	378.824	236	311.891	471

Fonte de dados: CPDE/DNSP

Os números que ilustram os óbitos podem ser enganadores na medida em que muitos óbitos devido a *Salmonella* spp. não são reportados sobretudo nas comunidades onde as estruturas sanitárias apresentam debilidades na vertente epidemiológica. É do conhecimento da sociedade médica e civil angolana os óbitos por perfuração intestinal nos hospitais e que não são reportados às autoridades. Deste modo as estatísticas conhecidas não apresentarem a verdadeira dinâmica da situação em Angola nem refletem as reais implicações da febre tifóide e outras salmoneloses na saúde dos angolanos. Também resulta difícil, desta forma, estimar o impacto da resistência aos antimicrobianos a julgar pelas condições disponíveis para a monitorização laboratorial da mesma (resistência), embora saibamos que a venda informal de medicamentos e em especial dos antibióticos, assim como o consumo inadequado dos mesmos, é uma realidade que requer medidas de correcção urgentes.

1.5.3. Serviços de comércio e bens alimentares em Angola

A globalização trouxe benefícios sobretudo na área do comércio de bens de consumo tais como alimentos de origem animal, carne, leite e seus derivados, frango, ovos, peixe e outros, mas também providenciou e criou a forma mais fácil de disseminação de serovares de *Salmonella* spp. de um continente, país, ou de uma região para a outra. A globalização facilitou uma das principais cadeias epidemiológicas na disseminação das salmonella no mundo com impacto imprevisível quer do ponto de vista clínico com serovares mais virulentos assim como a disseminação de estirpes de *Salmonella* spp. multiresistentes. Assim sendo o formato do comércio de bens alimentares em Angola e em particular nas principais cidades do país oferece todas as condições favoráveis para a disseminação de salmonelas. O comércio é caracterizado maioritariamente pelo mercado informal com a venda ambulante a dominar o sistema, com os alimentos que necessitam de condições de conservação a serem comercializados em qualquer esquina sem a observância de medidas higiénicas adequadas, alimentos como carne, verduras, leite e seus derivados só para citar alguns, constituindo assim uma forma importante na cadeia de transmissão de doenças e em particular a salmonelose não Typhi. Este facto associado às debilidades do sistema de inspecção sanitária e da fiscalização económica propicia todas as condições necessárias para a presença permanente de casos de salmonelose, *S. enterica* ser. Typhi e *S. enterica* ser. Paratyphi responsáveis pela propagação da febre entérica e infecções gastrointestinais

em regiões endémicas, sendo a ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes de portadores crónicos a via de transmissão mais comum (Crump, Luby & Mintz, 2004; Bhan, Bahl & Bahtnagar, 2005). A julgar pelas debilidades nas condições de higiene e saneamento do meio, condições económicas desfavoráveis de muitas famílias, associado ao desconhecimento do estado de portador crónico, podemos afirmar que *S. enterica* ser. Typhi e *S. enterica* ser. Paratyphi têm percentagens de incidência altas de acordo com os dados fornecidos pelo Centro de Processamento de Dados Epidemiológicos (CPDE) da Direcção Nacional de Saúde Pública. Claramente, a não regulação e controlo dos sectores de Agricultura e Comércio, constituem sectores chaves na cadeia epidemiológica da salmonelose, já que os alimentos constituem a principal fonte de infecção e o comércio, por sua vez, facilita a circulação e troca de produtos produzidos entre localidades, regiões e países aumentando assim as probabilidades de introdução de novos serovares e muitos destes podem ser multiresistentes. Este problema para a saúde pública tem agora contornos preocupantes em Angola se tivermos em conta o surgimento em cada vez maior número de estirpes de *Salmonella* não Typhi a provocarem bacteremia e com características multiresistentes.

Como foi anteriormente referido e apesar do crescente reconhecimento da importância da epidemiologia da febre tifóide e das outras salmoneloses, continua a existir uma grande subnotificação de casos em Angola, justificada por vários motivos, incluindo o elevado número de casos da doença que não são diagnosticados clínica e laboratorialmente, dificuldades de acesso aos serviços de saúde, não reconhecimento de casos suspeitos e uso de forma precoce e empírica de antimicrobianos em situações clínicas não esclarecidas ou acompanhadas, o que propicia o surgimento de estirpes resistentes aos antimicrobianos.

Não obstante da existência de normas e guias terapêuticos para o tratamento da febre tifóide em Angola, a terapêutica em muitos casos é feita por critérios de conveniência dos profissionais de saúde. A ausência de laboratórios de microbiologia para auxiliar a terapêutica, constitui um dos factores do tratamento empírico praticado pelos profissionais de saúde. Por outro lado, o advento de novos fármacos de largo espectro (cefalosporinas, quinolonas, *etc.*) para lidar com as infecções bacterianas trouxe consigo o espírito de uso indiscriminado para tratamento de muitas infecções e em muitos casos com uma prescrição errónea, aumentando a pressão sobre o uso dos antimicrobianos e

consequentemente o surgimento de estirpes resistentes. O facto de muitos antimicrobianos ainda serem comercializados no mercado informal estimula ainda mais a automedicação, sobretudo nas comunidades onde a prevalência de casos de febre tifóide se faz sentir e com a existência de debilidades dos serviços de saúde para o acompanhamento do doente. Este é um problema generalizado por toda Angola.

1.5.4. Organização dos serviços básicos da saúde em Angola

A República de Angola é um país africano de referência no âmbito político, económico e na diplomacia internacional, fruto das conquistas alcançadas. Apesar dos investimentos feitos no domínio da saúde, os indicadores de saúde publicados oficialmente estão ainda aquém da média dos países africanos e do mundo desenvolvido.

O país encontra-se num contexto de economia de mercado, caracterizado entre outros aspectos pela diversificação das fontes de rendimento e pela privatização de bens e serviços. Este ambiente económico potencia o “mercado da saúde” que exige da parte do Estado um forte papel de regulação a fim de garantir a protecção social das populações mais pobres, os interesses do Estado e os benefícios dos agentes económicos envolvidos em actividades da saúde.

O país está a viver uma transição em saúde com incidência nos indicadores demográficos, epidemiológicos e nutricionais. Em termos demográficos a tendência tem sido para a redução da taxa de fecundidade, redução da taxa de mortalidade infantil, redução da taxa de mortalidade geral, aumento da esperança de vida à nascença e perfil etário intermédio com crianças, jovens e adultos. A transição epidemiológica é caracterizada pelo peso duplo das doenças transmissíveis (decorrentes de deficientes condições de abastecimento de água potável, higiene, saneamento e alimentação) e das doenças crónicas (decorrentes dos novos estilos de vida, tais como o sedentarismo, o excesso de consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo, o uso de outras drogas e outros factores de risco associados às doenças crónicas). Nesta componente necessita-se de dar mais atenção às medidas de promoção e protecção da saúde, prevenção das doenças, informação e mobilização social de forma a garantir uma maior consciencialização e participação das comunidades nas intervenções a favor da saúde. Deveremos dar melhor resposta às determinantes das doenças, e prevenir os riscos de epidemias, pandemias e de outras catástrofes, garantindo

deste modo a segurança nacional em redução do peso das doenças, diminuição dos índices de mortalidade materna e infantil, e aumento da esperança de vida à nascença.

A análise mais recente dos indicadores de saúde globais mostrou uma melhoria significativa relativamente ao rácio da mortalidade materna, que passou de 1400 mortes maternas por 100.000 nados vivos em 2001, para 460 por 100.000 em 2011.

saúde, e contribuindo para a segurança em saúde a nível mundial. A melhoria do padrão epidemiológico do país deverá conduzir-nos à

A taxa de mortalidade neonatal em 2001 foi de 98 por 1000 nascidos vivos, reduziu para 42 por 1000 nascidos vivos em 2010. A mortalidade infantil evoluiu de 150 óbitos por 1000 nascidos vivos em 2001 para 101 em 2011. A mortalidade em menores de cinco anos passou de 250 em 2001 para 167 em 2011. A mortalidade em adultos (15-60 anos) em 2012 era de 314 por 1000 habitantes comparando com a taxa média de 383 por 1000 habitantes na região Africana (Tabela 4).

Tabela 4. Principais indicadores de saúde em Angola e na Região Africana

Indicadores	Angola	Região Africana
Esperança de vida	62 Anos	58 Anos
Taxa de Mortalidade Neonatal	42 / 1000 NV	36 / 1000 NV
Mortalidade em menores de 1 ano de idade	101 / 1000 NV	60 / 1000 NV
Mortalidade em menores de 5 anos de idade	167 / 1000 NV	90 / 1000 NV
Mortalidade materna	4,5 / 1000 NV	5 / 1000 NV
Taxa de mortalidade em adultos 15-60 anos de idade	314 / 1000 Hab	383 / 1000 Hab
Acesso aos serviços de saúde	44,6%	Informação não disponível

Apesar da melhoria registada nos indicadores de saúde, Angola ainda tem uma elevada taxa de mortalidade materna, infantil e infanto-juvenil, alta incidência de doenças infecciosas e parasitárias com destaque para as grandes endemias, doenças respiratórias e doenças diarreicas, um nível de malnutrição ainda elevado em menores de 5 anos, epidemias recorrentes de cólera, raiva, sarampo e malária, e um aumento exponencial das doenças crónicas não transmissíveis, incluindo os traumatismos por sinistralidade rodoviária e violência. As doenças transmissíveis são responsáveis por mais de 50% dos óbitos registados na população geral.

Os problemas de saúde actuais estão relacionados com as determinantes da saúde e o fraco desempenho do Sistema Nacional de Saúde. Os serviços de saúde enfrentam

problemas de gestão dos recursos humanos, materiais e financeiros para além de estarem sub-financiados, o que constitui um enorme desafio.

Ao abrigo da Lei de Bases do Sistema Nacional de Saúde, é da responsabilidade do Estado angolano a promoção e garantia do acesso de todos os cidadãos aos cuidados de saúde nos limites dos recursos humanos e financeiros disponíveis. No entanto, a promoção e a defesa da saúde pública são efectuadas através da actividade do Estado e de outros agentes públicos ou privados, podendo as organizações da sociedade civil serem associadas àquela actividade. Assim, os cuidados de saúde são prestados por serviços e estabelecimentos do Estado ou sob fiscalização deste, por outros agentes públicos ou entidades privadas, com ou sem fins lucrativos. Sendo que, a protecção à saúde constitui um direito dos indivíduos e da comunidade, que se efectiva pela responsabilidade conjunta dos cidadãos, da sociedade e do Estado, em liberdade de procura e de prestação de cuidados de saúde.

Historicamente, podemos caracterizar a evolução do (SNS) de Angola em dois períodos: O período colonial que vai até 11 de Novembro de 1975; o período pós independência com início em 11 de Novembro de 1975 sendo este período ainda subdividido em duas sub-épocas: O período que se seguiu à independência, caracterizada por uma economia planificada, de orientação socialista, a que se seguiu o período de economia de mercado com início em 1992.

No período a seguir à independência, foram estabelecidos através do SNS, os princípios da universalidade e gratuidade dos cuidados de saúde, exclusivamente prestados pelo Estado, assentes na estratégia dos Cuidados Primários de Saúde (CPS). Este período foi também caracterizado na primeira década da independência, pelo alargamento da rede sanitária e pela escassez de Recursos Humanos em Saúde (RHS), segundo dados estatísticos, na altura, no período a seguir à independência, só se encontravam em Angola pouco mais de 20 médicos, tendo, na ocasião, o Governo/Estado, que recorrer à contratação de profissionais recrutados ao abrigo dos acordos de cooperação. Na segunda fase do período pós-independência, a primeira parte deste é caracterizada pelo recrudescimento do conflito armado (guerra civil), reformas políticas, administrativas e económicas que tiveram de certa maneira, um impacto negativo sobre o Sistema Nacional de Saúde (SNS), tais como: a destruição e redução drástica da rede sanitária.

Em 1992, através da Lei 21-B/92, de 28 de Agosto, é aprovado a Lei Base do SNS de Angola e o Estado angolano deixa de ter exclusividade na prestação de cuidados de saúde, com a autorização do sector privado na prestação dos serviços de saúde. Foi também introduzida a noção de comparticipação dos cidadãos nos custos de saúde. Com o alcançar da paz interna, que se traduziu numa estabilidade macroeconómica, um intenso esforço de reabilitação e reconstrução nacional foi efectuado e do qual muito tem beneficiado o SNS. Neste período, registou-se um aumento significativo dos recursos financeiros do Estado alocados ao sector da saúde tendencialmente gratuito de acordo com o Programa Nacional de Desenvolvimento Sanitário (Política Nacional de Saúde – PNDS, MINSA).

Atualmente, o sistema de prestação de cuidados de saúde subdivide-se em três níveis hierárquicos de prestação de cuidados da saúde, baseados na estratégia dos cuidados primários. O primeiro nível - Cuidados Primários de Saúde, representado pelos Postos/Centros de Saúde, Hospitais Municipais, postos de enfermagem e consultórios médicos, constituem o primeiro ponto de contacto da população com o Sistema de Saúde.

O nível secundário ou intermédio, representado pelos Hospitais gerais, é o nível de referência para as unidades de primeiro nível. O nível terciário, é representado pelos Hospitais de referência mono ou polivalentes diferenciados e especializados, é o nível de referência para as unidades sanitárias do nível secundário.

A baixa cobertura sanitária, o desigual e reduzido acesso assim como a inoperacionalidade de um sistema de referência e contra referência, afectam o desempenho do SNS. Estima-se que apenas cerca de 30% a 40% da população tem acesso aos serviços de saúde. No nível dos cuidados primários de saúde, desenvolvem-se actividades preventivas e curativas de doenças e lesões correntes, tais como educação para a saúde, consultas pré e pós-natal, planeamento familiar, assistência ao parto e cuidados obstétricos básicos e completos, vacinação, controlo do desenvolvimento e crescimento da criança.

Nos níveis secundários e terciários, que correspondem aos hospitais provinciais, centrais e de especialidade, realizam mais de 50% das consultas de carácter de urgência. Não existe um sistema eficaz de marcação de consultas externas. Na província de Luanda, estão concentrados os maiores centros hospitalares de especialidades, mas a capacidade de resposta e de resolução não satisfaz as necessidades da população. Esta situação leva

a que os direitos do cidadão de escolher o serviço e o prestador, de receber ou recusar cuidados, mantendo a sua privacidade, o respeito, a confidencialidade dos dados pessoais, a informação sobre a sua situação de saúde, bem como a assistência religiosa, não são muitas vezes respeitados.

Em relação às infra-estruturas, sublinha-se que a rede pública de prestação de cuidados de saúde é constituída por 3.023 unidades sanitárias, sendo 2.120 postos de saúde, 700 centros de saúde, 145 hospitais municipais, 46 hospitais provinciais e 12 hospitais centrais. Estes dados são ainda insuficientes para atender à procura da população em todo o país. Para além do reduzido número de unidades sanitárias, outras questões principais prendem-se com a ausência de manutenção, de padrões para as infra-estruturas, do plano director e de orientação para a construção e implantação territorial, condizentes com uma melhor e equilibrada cobertura sanitária e acessibilidades da população aos cuidados de saúde. No entanto, nos últimos anos registou-se um investimento acentuado nas infra-estruturas de saúde com a reabilitação das unidades sanitárias bem como a construção de outras unidades novas. Para assegurar o funcionamento destas unidades, este investimento deve ser complementado com a disponibilidade de recursos humanos, logística e recursos financeiros para as despesas correntes.

Em complementaridade com a Política Nacional de Saúde o país conta actualmente com a Política Nacional Farmacêutica aprovada pelo Decreto Presidencial nº 180/10 de 18 de Agosto de 2010. O aprovisionamento de medicamentos e outros meios médicos é assegurado pela Central de Compras e Aprovisionamento de Medicamentos e Meios Médicos (CECOMA), criada ao abrigo do Decreto Presidencial nº 34/11, de 14 de Fevereiro de 2011. Contudo, o sector farmacêutico necessita de uma abordagem integrada para aumentar a cobertura da população em medicamentos essenciais seguros e a um custo acessível. Do mesmo modo, necessita de trabalhar para a elaboração da Lista Nacional de Medicamentos (LNM), elemento chave para a selecção de medicamentos, bem como o formulário nacional de medicamentos e os guias terapêuticos são ferramentas importantes de apoio ao uso racional de medicamentos.

A inexistência de normas técnicas destinadas a assegurar a racionalidade e a transparência dos procedimentos de aquisição de fármacos, contribuem para que os mesmos sejam importados por instituições não vocacionados para o efeito, obtendo-os de qualquer fonte,

a preços e prazos de validade não controlados e sem mecanismos que salvaguarde a sua qualidade.

O Estado continua a ser o maior importador dos medicamentos para o sector público. As unidades sanitárias dos sectores públicos, que gozam de autonomia financeira e as unidades sanitárias privadas adquirem também os seus medicamentos junto dos importadores locais. Outras instituições governamentais, estranhas ao Ministério da Saúde, intervêm adquirindo avultadas quantidades de medicamentos para o sector público, tanto ao nível central como nas províncias. Estas aquisições, regra geral, não vão de encontro às necessidades e prioridades identificadas pelo sector da saúde. O fornecimento de medicamentos essenciais para a rede de assistência primária é centralizado. A aquisição dos kits é feita por órgãos centrais do Ministério da Saúde, através de concursos públicos. No entanto, não se cumpre um programa regular de compras, o que origina frequentes rupturas de stock.

Apesar das dificuldades económicas recentes, há um conjunto de prioridades que enquadram as grandes linhas estratégicas de desenvolvimento do sector da saúde em Angola. As prioridades do SNS em Angola até 2025, consistem no desenvolvimento sustentável e o combate à pobreza, que visam o seguinte: Redução da mortalidade materna e infantil; Controlo de doenças transmissíveis e não transmissíveis; Adequação dos recursos humanos e tecnológicos de saúde; Asseguramento de um financiamento sustentável, Gestão eficiente dos recursos (PNDS - MINSA).

1.5.5. Os serviços clínico-laboratoriais prestados às populações em Angola e o seu impacto no controlo das infecções por *Salmonella* spp.

Os serviços clínicos ou médicos estão presentes na (SNS) de Angola. Estes apesar das dificuldades, desempenham o seu papel dentro do contexto e as condições que as infraestruturas sanitárias oferecem. No entanto, a pressão exercida em todo (SNS), é também sentida com muita intensidade nos serviços clínicos nas mais variadas formas. A prevalência de muitas doenças transmissíveis entre estas a malária, tuberculose, VIH, doenças respiratórias agudas assim como as infecções gastrointestinais, entre outras, pressionam ainda mais os profissionais de saúde em particular a classe médica, por não disporem na maioria, de condições indispensáveis ao exercício da actividade médica e

medicantosa. A ausência de serviços de apoio laboratorial sobretudo para o diagnóstico microbiológico constitui uma limitação à correcta prática clínica para o diagnóstico e seguimento de uma determinada patologia, aumentando desta forma a curiosidade ou a ineficácia no tratamento de muitas infecções. No exercício da prática de medicina em Angola, é comum constatar por exemplo, que toda a suspeita clínica de uma salmonelose é quase sempre atribuída a *S. enterica* ser. Typhi contrastando com os verdadeiros critérios para o diagnóstico diferencial das *Salmonella* quer do ponto de vista clínico como laboratorial. Por razões já mencionadas anteriormente sobre as debilidades de diagnóstico laboratorial, nem todos os casos com suspeita clínica de febre tifóide são necessariamente casos de febre tifóide. Existem situações em que o doente que vai ao médico já leva consigo a sua suspeita clínica, induzindo deste modo a erros na abordagem da doença, sobretudo quando o médico não é capaz de analisar e interpretar o estado clínico do doente por falta de exames complementares do diagnóstico presuntivo. Assim, é essencial para o controlo das salmoneloses em Angola a existência de um eficaz e efectivo (PNDS -MINSa) sistema de exames laboratoriais que conduzam a diagnósticos clínico-laboratoriais completos. Não basta somente realizar testes bioquímicos ou rápidos é preciso determinar a serotipagem das estirpes de *Salmonella* spp. e consequentemente usar técnicas de biologia molecular para se poder estar em condições de afirmar se estamos perante uma infecção devido a *S. enterica* ser. Typhi ou outra Salmonelose e passarmos a ter dados reais e atuais da epidemiologia destas infecções.

A insuficiência na capacidade de estrutura de diagnóstico laboratorial para o isolamento e identificação dos diferentes agentes etiológicos e entre estes os serovares de salmonelas, têm tido implicações directas no manuseamento, tratamento, seguimento e controlo de casos suspeitos. De notar que, das poucas instituições que realizam a cultura para o isolamento das *Salmonella* spp, quase todas estão baseadas em Luanda, quer instituições do sector público como do sector privado. A ausência de laboratórios de microbiologia para a realização de isolamentos bacterianos com objectivo de apoiar os serviços clínicos e epidemiológicos, repercutem de forma negativa na vigilância laboratorial da doença e consequentemente na realização de teste de sensibilidade aos antimicrobianos, aumentando assim a incerteza sobre o êxito do tratamento. Os poucos laboratórios que realizam a cultura para o isolamento de salmonelas, somente estão capacitados para a identificação bioquímica, fazendo com que o nível de incerteza sobre a presença ou não

de uma *S. enterica* ser. Typhi aumenta, e desta forma o desconhecimento da morbilidade de diferentes serovares de salmonelas e seu impacto na saúde das pessoas. O isolamento e identificação de agentes infecciosos no laboratório requiere profissionais capacitados e especialistas devido ao grau de exigência que este tipo de trabalho oferece, assim sendo, constitui uma debilidade e preocupação a formação de técnicos neste sentido. Os recursos humanos disponíveis para o serviço de microbiologia são escassos e necessitam ser capacitados para corresponderem às exigências do momento.

Assim sendo, e tal como foi referido anteriormente, o Teste de Widal constitui praticamente o Teste de Referência-Padrão quando se trata de casos suspeitos de febre tifóide em Angola, e sem a possibilidade de identificação de outras salmonelas. Por fim, devemos afirmar que em Angola o diagnóstico de *Salmonella* spp. ainda está longe de ser uma realidade marcante nos serviços de diagnóstico laboratorial, por não estarem ainda criadas as devidas condições na maior parte das infraestruturas de assistência a saúde ou ainda em outros serviços fora do (SNS). Em relação às febres entéricas causadas por *Salmonella* Typhi e Paratyphi o diagnóstico é feito principalmente pelo teste de Widal, o que limita a identificação do verdadeiro agente entérico responsável pela infecção. A ausência de serviços para isolamento e consequentemente a caracterização das estirpes de *Salmonella* spp com métodos fenotípicos e genotípicos, assim como a monitorização de resistência aos antimicrobianos, constitui um factor limitante importante para a compreensão da morbilidade e mortalidade da doença tornando difícil desta forma traçar uma estratégia para o controlo da doença.

1.5.6. Vigilância epidemiológica e segurança alimentar em Angola

Em África e em Angola em particular, a vigilância epidemiológica das salmonelas é uma actividade com pouca expressão, esta actividade é exercida em muito poucas instituições e não de forma constante devido aos problemas organizativos e por falta de investimentos apropriados nos programas de vigilância epidemiológica com impacto para a saúde pública; por outro lado a ausência de regulamentação e definições claras sobre a política de saúde pública em relação as salmoneloses fazem com que a pouca actividade de vigilância epidemiológica seja restringida somente para *S. enterica* ser. Typhi. Em África, e em particular Angola, os factores de risco não estão ainda bem caracterizados e por consequente as intervenções baseadas nas actividades de vigilância e prevenção são

limitadas, proporcionando um ambiente verdadeiramente de alta morbidade associado ao deficiente saneamento do meio. É difícil realizar uma verdadeira vigilância epidemiológica das salmonelas quando não existe de forma abrangente as condições de infraestruturas de apoio e laboratoriais capazes de responder e contribuir para a orientação das acções preventivas em saúde pública, sobretudo na educação para a saúde. As salmoneloses por não serem uma doença de notificação obrigatória, tornam ainda mais difícil a preocupação de vigilância epidemiológica, mesmo sabendo da necessidade e importância do controlo das infecções por salmonelas. A segurança alimentar passa necessariamente por se dispor de capacidade de detectar, controlar e prevenir a contaminação alimentar e outras infecções entéricas (Wain, *et al.*, 2015). A inexistência de dados sobre o impacto das salmoneloses em Angola, torna difícil estimar o impacto desta doença nos alimentos, no entanto, é comum os problemas de infecções entéricas entre a população., tal como anteriormente referido, torna-se quase impossível falar de segurança alimentar na medida em que os produtos alimentares como verduras, frutas e de origem animal (carnes, peixe e frágos) são comercializados nos mercados informais em condições higênicas duvidosas (Figura 2) e sem a fiscalização das estruturas competentes. Esta situação, cria preocupações acrescidas sobre o que consumir e onde adquirir, quando uma boa parte da população faz uso do mercado informal. Só com a combinação de políticas e estratégias ligadas a vigilância epidemiológica e segurança alimentar, será possível conhecer a magnitude e a importância da vigilância das doenças e consequentemente contribuir para um melhor desempenho da componente de saúde pública.



Figura 2. Venda de carne em condições não adequadas no mercado informal de Luanda-Angola.

1.5.7. Saneamento do meio ambiente em Angola

A OMS, define o Saneamento, como o controlo de todos os factores ambientais que podem exercer efeitos nocivos sobre o bem-estar, físico, mental e social dos indivíduos de uma determinada comunidade. Entre muitos factores podemos mencionar a poluição do ar (emissão de gases), do solo (lixo urbano) e águas e de esgotos a céu aberto, ocupação desordenada do solo (margens de rios, morros, *etc.*), *etc.* Onde o correcto saneamento não está presente as doenças causadas por *Salmonella* spp. cólera, e aquelas causadas por *E. coli* e outros agentes patogénicos entéricos são comuns (OMS, 2015).

Em África, as doenças diarreicas representam 70% das infecções transmitidas por alimentos em crianças menores de 5 anos devido ao consumo de água e alimentos contaminados, e as salmoneloses provocam 32.000 mortes por ano nesta região (OMS, 2015). Estes dados são consequência na maior parte dos casos do deficiente ou ausência do saneamento básico do meio, pois as crianças são mais vulneráveis às doenças originadas pela ausência de água potável e tratamento de esgotos. A expansão urbana sem o devido planeamento torna esse problema ainda mais complexo, com a ocupação de áreas sem infraestruturas adequadas para as moradias; associado a pobreza nas comunidades, o que torna insustentável a situação do saneamento do meio sobretudo quando os governos são incapazes de controlar a situação. Angola enfrenta grandes problemas de saneamento do meio sobretudo nas grandes cidades e em particular a capital do país, Luanda; apesar dos esforços das autoridades em pretenderem criar um ambiente saudável junto das comunidades, este esforço não é acompanhado pelas próprias comunidades por falta de educação sanitária quer na perspectiva individual como colectiva. Por outro lado, o conflito armado que assolou o país durante décadas, contribuiu negativamente para a ocupação de forma desordenada de terra para construção sem qualquer acompanhamento das autoridades, este facto trouxe a superlotação das periferias das cidades sem os requisitos básicos de saneamento do meio. A proliferação de mercados informais e a comercialização de alimentos em ambiente inadequado e contra todas as normas higiénicas recomendadas, aumenta a probabilidade de ocorrência de doenças devido à contaminação do meio ambiente. A falta de eficiência das infraestruturas vocacionadas para o tratamento de esgotos e saneamento do meio, contribui para o fraco saneamento do meio em todas as vertentes. A ausência de saneamento do

meio intensifica a poluição hídrica, e propicia a proliferação de doenças, como a hepatite A, febre tifóide, febre amarela, doenças diarréicas, cólera, amebíase e malária, visto que essas enfermidades podem ser provocadas pelo contacto com água de esgoto (parasitas presentes em dejetos humanos), consumo de alimentos ou água contaminada (Figura 3).

A formação de especialistas em engenharia ambiental torna-se imprescindível para elaboração de sistemas urbanos de abastecimento de água, tratamento de esgotos e resíduos sólidos adequados e eficazes, assim como para operar em redes de monitorização de água e solo, *etc.* colaborando com empresas públicas e privadas de saneamento ambiental e gestão do meio ambiente e da saúde, assim como com os serviços de laboratórios de controlo da qualidade ambiental, de estudos de impacto ambiental pela indústria e ainda os laboratórios de Saúde Pública.

Assim, e após o anteriormente descrito, podemos sumariar e esquematizar na figura 4 os factores predisponentes para a actual emergência de salmoneloses em Angola. Importa salientar que, tal como referido anteriormente, a maioria dos dados oficiais sobre salmoneloses em Angola são de notificação clínica de suspeitas sem qualquer confirmação laboratorial ou epidemiológica. Tal como já referido, as salmoneloses em África, e em Angola em particular, estão longe de estar bem estudadas e compreendidas, em grande parte devido ao insuficiente apoio do diagnóstico laboratorial e infra-estruturas de saúde pública para apoiar estudos epidemiológicos e clínico-laboratoriais. Assim, existe hoje uma enorme escassez de informação científica e epidemiológica fidedigna que caracterize a situação real em Angola e propomos corrigir este défice através deste estudo sistemático e com o objectivo definido de contribuir para a primeira caracterização da situação epidemiológica atual.



Figura 3. Aspectos de saneamento básico na comunidade: problemas e consequências para a saúde.

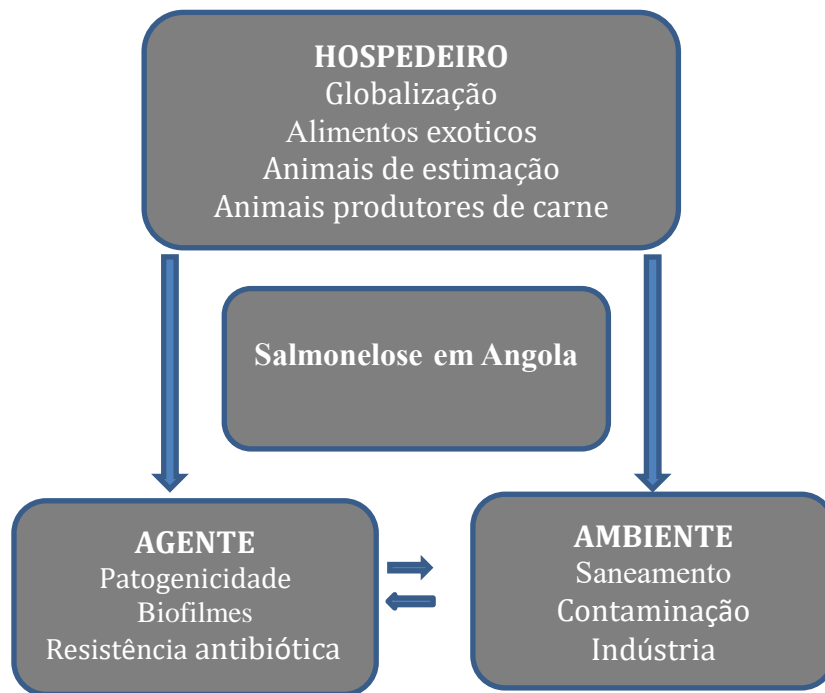


Figura 4. Factores predisponíveis para a emergência da Salmonelose em Angola.

2. Objetivos

2.1. Objectivo geral

O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento epidemiológico-laboratorial para a caracterização microbiológica, fenotípica e molecular das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de amostras clínicas, alimentos e águas residuais na região de Luanda durante o período de Agosto de 2013 a Novembro de 2015 e assim contribuir para a caracterização da situação epidemiológica real, de modo a poder vir-se a implementar medidas de controlo e prevenção eficazes.

2. 2. Objectivos específicos

1. Colher, processar, isolar, identificar e caracterizar os diferentes serovares de *Salmonella* spp, isoladas de amostras clínicas, águas residuais e alimentos de Agosto de 2013 a Novembro de 2015 em Luanda.
2. Determinar os padrões de resistência aos antibióticos com base nos métodos fenotípicos de determinação da concentração mínima inibitória segundo as indicações do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI), e genotípicos através de PCR e multiplex PCR.
3. Avaliar a clonalidade dos isolados através de PFGE e classificar em grupo e subgrupo clonal as estirpes isoladas, comparando-as com as bases de dados epidemiológicas mundiais.
4. Estabelecer a relação epidemiológica entre estirpes de origem clínica, alimentar e ambiental e seu possível impacto na saúde pública de Angola.
5. Contribuir para uma caracterização baseada em evidências epidemiológicas de campo e moleculares, clínicas e laboratoriais da situação epidemiológica real das infecções por *Salmonella* spp. em Luanda, Angola.

3.Material e Métodos

3.1. Origem das amostras

O trabalho desenvolvido ao longo desta Tese incidiu sobre uma coleção de 290 amostras, clínicas (n=150), alimentares (n=90) e ambientais (n=50), provenientes de várias localidades da Província de Luanda, Angola e colhidas entre Agosto de 2013 e Novembro de 2015 (Figura 5). Entre estas, foram identificados 65 isolados de *Salmonella* spp., sendo 42 de origem clínica humana, provenientes de hospitais e de ambulatório (Clínica Sagrada Família, Instituto Nacional de Saúde Pública, Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina, Universidade Agostinho Neto); 10 isolados com origem em alimentos diversos e 13 isolados de origem ambiental (águas residuais).

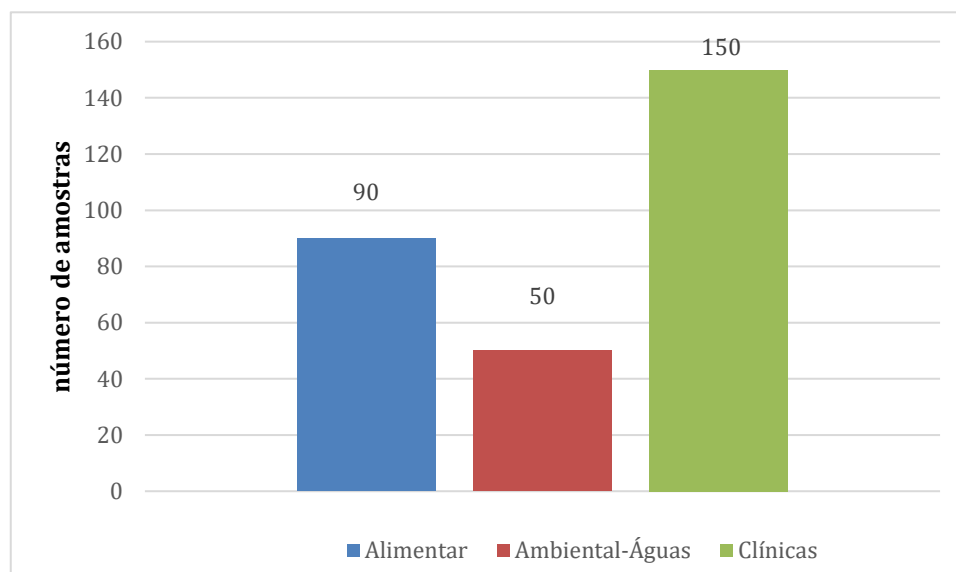


Figura 5. Distribuição das 290 amostras biológicas segundo a sua origem.

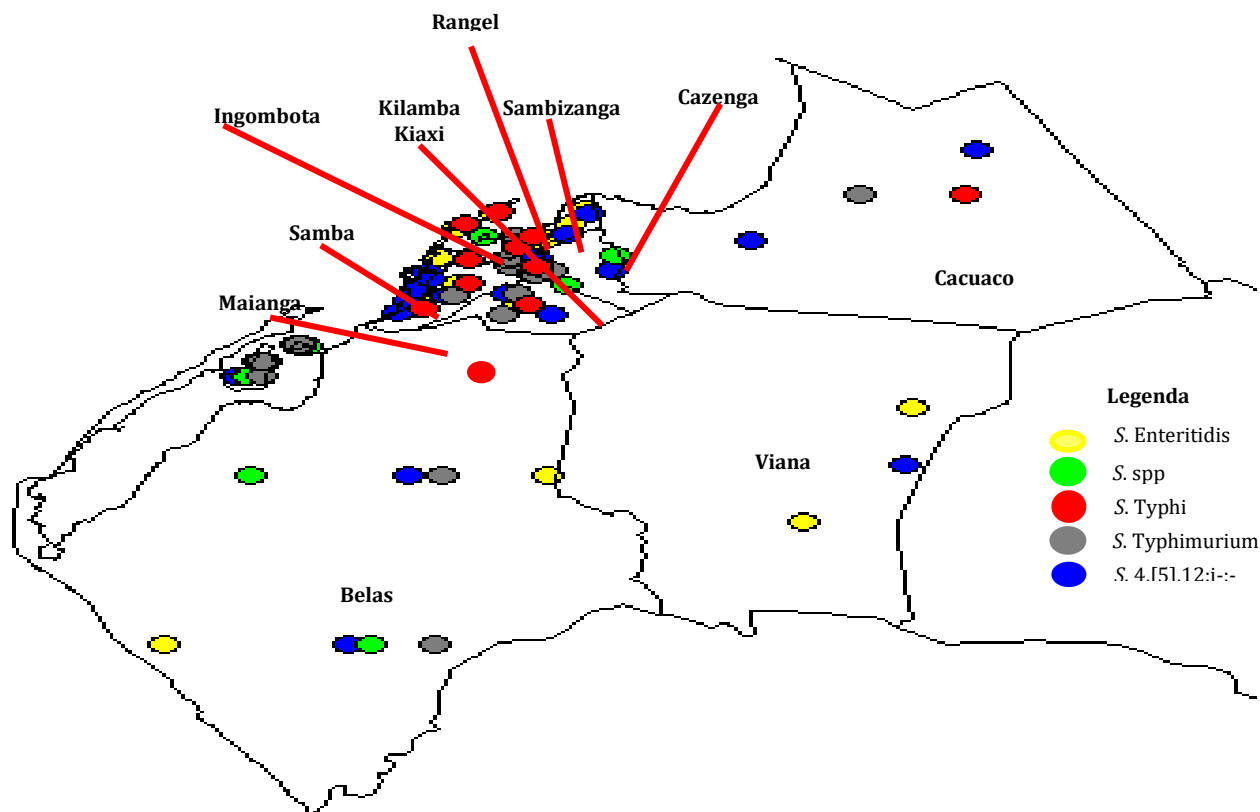


Figura 6. Proveniência das 290 amostras biológicas, cidade de Luanda- Angola.

3.2. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

Amostras de origem clínica

As amostras de fezes colhidas em doentes com sintomatologia sugestiva de infecção por *Salmonella* spp. provenientes de hospitais (Clínica sagrada Esperança) e de ambulatório (Instituto Nacional de Saúde Pública, Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto), foram semeadas em meios de enriquecimento (caldo tetracionato) e selectivos (Agar MacConkey, XLD, Hectoen) para crescimento e isolamento de *Salmonella* spp, enquanto as amostras de sangue foram submetidas a rotina tradicional das hemoculturas. Todos os isolados de *Salmonella* spp. foram identificados por provas bioquímicas (produção de H₂S, crescimento em Citrato de Simons, hidrólise de ureia, produção de indol, fermentação da glicose + gás, fermentação de lactose, fermentação de sacarose, Voges-Proskauer, etc.), de acordo com as normas padronizadas para o isolamento de *Salmonella* (CDC/WHO, 2010) e por sistema semi automatizado VITEK 2 Compact 15 (Biomérieux-França). Todos os isolados foram acondicionados em congelamento a -70 °C em TSB (Oxoid) suplementado com 15 % de glicerol (Applichem-Panreac).

Tabela 5. Proveniência das amostras clínicas (2013-2015).

Amostra	Inst. Saúde Pública	Clinica S. Esperança	Faculdade Medicina
Fezes	8	22	4
Sangue	-	8	-
Total	8	30	4

Amostras de origem alimentar e ambiental

Os isolados de *Salmonella* spp. foram detectados por métodos padrão (ISO 6579). Ver **Fluxograma 1 e 2** nesta secção. Os alimentos analisados foram obtidos de forma aleatória a partir de várias localidades do mercado formal e informal da cidade de Luanda, colhidas em recipientes estéreis e colocadas em caixa isotérmica para acondicionamento e transporte das mesmas. As amostras de águas residuais foram colhidas em duplicado a uma profundidade de aproximadamente 30 cm da superfície, utilizando-se garrafas de vidro âmbar, com capacidade de 1000 mL, e foram colocadas em caixas isotérmicas e transportadas para o laboratório de microbiologia de águas do Instituto Nacional de Saúde Pública. Em seguida foram filtradas através de um sistema de rampa filtração. Todas as amostras foram pré-enriquecidas em água peptonada tamponada e foram incubadas durante 24 horas a 37°C. De seguida, 0,1 ml das culturas pré-enriquecidas foram transferidas para os caldos *Rappaport-Vassiliadis* (Oxoid) e de selenito (Difco), e incubadas a 41°C e 37°C, respectivamente. Após 24 h e 48 h de incubação, 10 µl de cultura de cada caldo enriquecido foram semeados em agar *Salmonella-Shigella* (SS) (Difco), em agar *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD) e em agar Hectoen e incubadas a 37°C por 24h. As placas foram examinadas quanto à presença de colónias típicas de *Salmonella* em agar SS e XLD (Figura 7). As colónias suspeitas foram identificadas como *Salmonella* por métodos bioquímicos convencionais (TSI, KIA, Caldo ureia, MIO, Citrato).

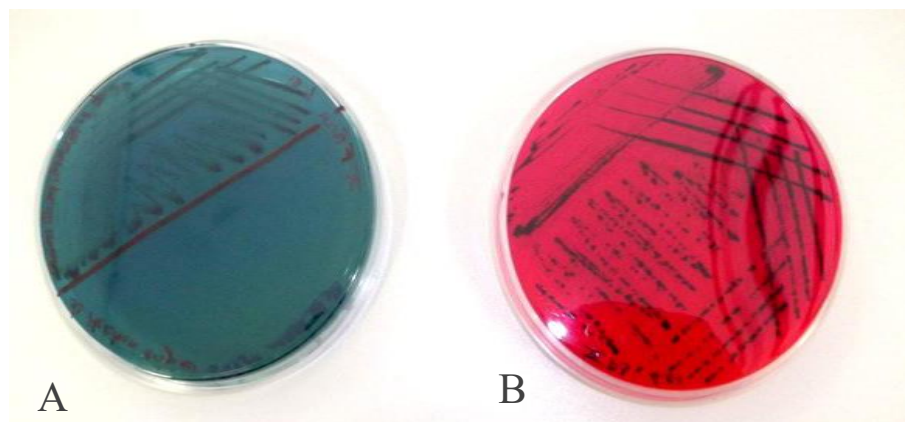
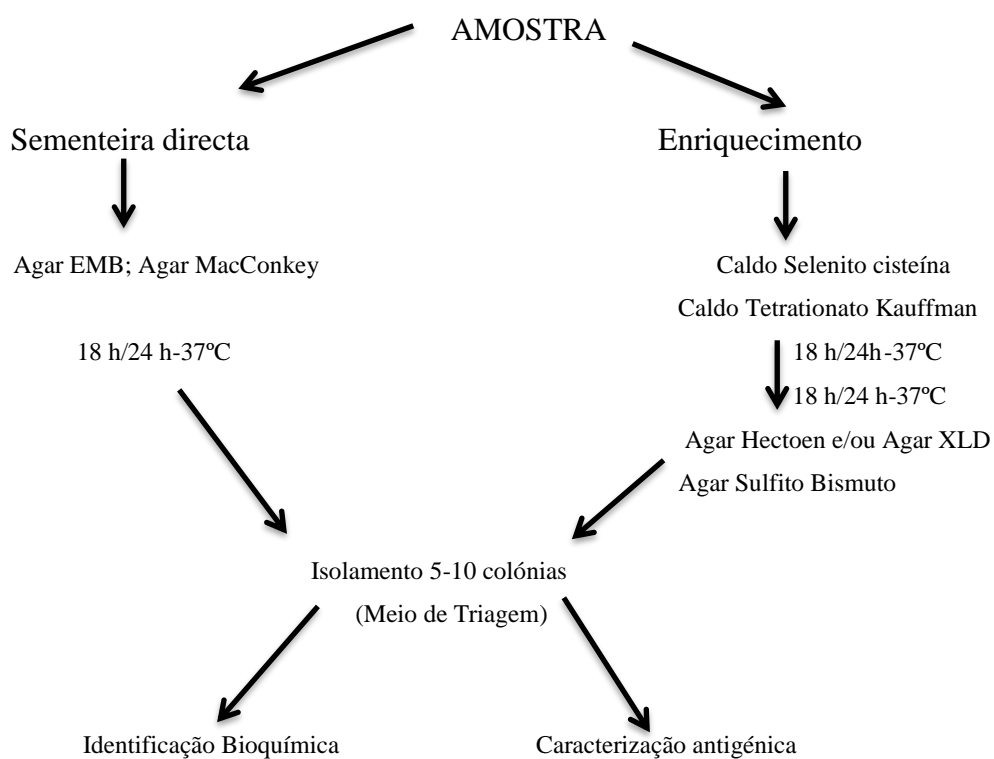
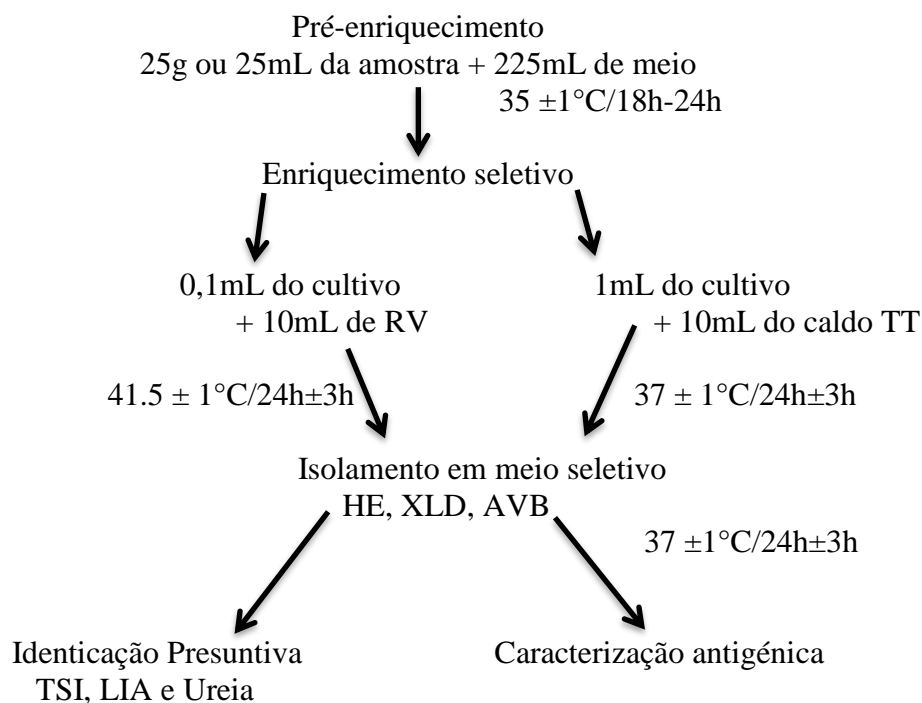


Figura 7. Morfologia de *Salmonella* spp. em placas de Hektoen (A) e XLD (B) após incubação a 37°C por 24h \pm 3h.

Fluxograma 1. Isolamento de *Salmonella* spp. em amostras de Fezes (suspensão) [CDC/WHO-2010].



Fluxograma 2. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp. em alimentos e amostras ambientais (Método ISO 6579).



3.3. Confirmação da identificação de *Salmonella* spp.

Após recepção dos isolados na Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade NOVA de Lisboa, Portugal, foi efectuada confirmação da identificação de *Salmonella* spp. ou *S. enterica* ser. Typhi pelo sistema comercial API 20E (Biomérieux, França) seguindo os procedimentos padrão definidos pelo fornecedor.

3.3.1. Serotipificação

A serotipificação dos isolados de *Salmonella* spp. foi feita com base no Esquema de *Kauffmann White-Le Minor* (Grimont & Weill, 2007), segundo o método de aglutinação utilizando soros comerciais, na Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal. O princípio do teste consiste na ocorrência ou não de uma reacção de

aglutinação entre a bactéria suspeita e o soro. Se a bactéria em causa apresentar os antígenos correspondentes, os anticorpos presentes no soro irão causar a aglutinação das bactérias, ocorrendo formação de um precipitado granuloso indicativo de uma reacção positiva. No caso contrário, a suspensão bacteriana apresentar-se-á leitosa e homogénea, e, portanto, negativa.

Cada isolado de *Salmonella* spp. ou *S. enterica* ser. Typhi foi semeado em *Nutrient Agar* (Scharlau, Barcelona, Espanha) e incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ para obtenção de cultura pura. Este passo foi repetido consecutivamente, pelo menos, duas vezes, antes de se efectuar a serotipificação.

Todos os isolados de *Salmonella* spp. foram testados serologicamente usando o antissoro polivalente O, monovalente O:9, e o antissoro H tipo-específico (Bio-Rad Laboratories, Inc. Richmond, CA, EUA) (Koneman, *et al.*, 1997). Uma gota de soro polivalente omni-O (soro anti-género *Salmonella*) foi colocada sobre uma lâmina de vidro, à qual se juntou, com uma ansa de 10µl, um pouco de cultura pura de um dado isolado. Homogeneizou-se até obter-se uma suspensão leitosa e agitou-se leve e brevemente. De seguida, observou-se a suspensão com recurso a iluminação directa para detectar a presença ou não de aglutinação. No caso de uma reacção positiva, continuou-se com os soros O polivalentes (OMA, OMB), utilizando a mesma metodologia para posteriormente afunilar o espectro de antígenos somáticos testados com soros monovalentes.

Os isolados de *S. enterica* ser. Typhi foram igualmente serotipados usando os antissoros monovalente O:9, H:d, Grupo D e Vi (Sifin Diagnostics GmbH, Berlim, Alemanha).

3.4. Extração de DNA genómico

A extracção de DNA genómico dos isolados classificados como *S. enterica* ser. Typhi foi efectuada através do sistema “QIAamp DNA Mini Kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Para os isolados classificados como *Salmonella* spp., a extração de DNA genómico foi feita pelo método por fervura (Malorny, *et al* 2003). Brevemente, semeou-se uma colónia isolada em 2 ml de meio líquido Luria-Bertani (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A) e incubou-se durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Seguidamente, transferiu-se 1ml de cultura para um tubo de centrífuga de 1.5 ml e centrifugou-se durante 5 minutos a 13 200 rpm, a 4°C . O sobrenadante foi descartado, e as células resuspensas em Tris-EDTA 10:1 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0),

submetendo-se a um processo de fervura durante 10 minutos. Após fervura, as amostras foram refrigeradas durante 30 segundos em gelo e procedeu-se a nova centrifugação, nos mesmos parâmetros da anterior centrifugação. Por fim, transferiu-se o DNA em suspensão para um novo tubo, descartando-se o sedimento. Todas as preparações de DNA foram mantidas a -20°C.

3.5. Confirmação molecular do género *Salmonella*

Existem diferentes métodos que podem ser utilizados para a confirmação do género *Salmonella*. A norma ISO 6579 (2002) (Aceite pela IAA e adoptada pela WHO GLOBAL Salm-Surv) preconiza a realização de testes bioquímicos, tendo a possibilidade de classificar até ao nível de subespécie.

Novos métodos, mais céleres, têm sido desenvolvidos, tais como novos meios seletivos, protocolos de isolamento diferentes, e vários protocolos de PCR e ELISA, entre outros (Malorny, *et al.*, 2003; Levin, 2009). Um dos métodos mais utilizado consiste na deteção por PCR de *invA*, um gene de virulência, localizado numa ilha de patogenicidade (SPI-1), que codifica uma proteína essencial para a invasão das células epiteliais do intestino e que se encontra em quase todos os isolados de diferentes serovares (Malorny *et al.*, 2003). Este foi o método escolhido para confirmação do género *Salmonella*, usando um protocolo adaptado de Malorny *et al.*, 2003 (Figura 8). O programa de amplificação e “primers” utilizados encontram-se descritos na (Tabela 6). Cada reação de PCR foi preparada num volume final de 25 µl, composta por 2 µl de DNA total da amostra, 10 pmol dos oligonucleótidos *invAf* e *invAr*, 1 U de Taq NZYTech (5U/µl) (MB00101-NZYTech, Lisboa, Portugal), 10µl de tampão de reacção (5X, NZYTech), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de desoxirribonucleótido trifosfatos (dNTPs) e água MilliQ necessária para perfazer o volume final. Para este protocolo foi usado um termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Tabela 6. Programa de amplificação e “primers” utilizados para detecção de um fragmento interno do gene *invA* e confirmação de género *Salmonella*.

Gene	Programa de amplificação	Sequência nucleotídica “primers” (5’-3’)	Amplicação (pb)	Referência
invA	94 °C – 2 min	<i>invAf</i> : GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA <i>invAr</i> : TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	Malomy <i>et al</i> , 2003
	94 °C – 30 seg			
	60 °C – 30 seg			
	72 °C – 1 min			
	72 °C – 10 min			

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1% (p/v), contendo 0,5 mg/L de brometo de etídeo durante 60 min a 80V (Figura 8). Os géis de agarose foram observados e fotografados pelo software ChemiDoc™ Gel Imaging System (XRS-BioRad).

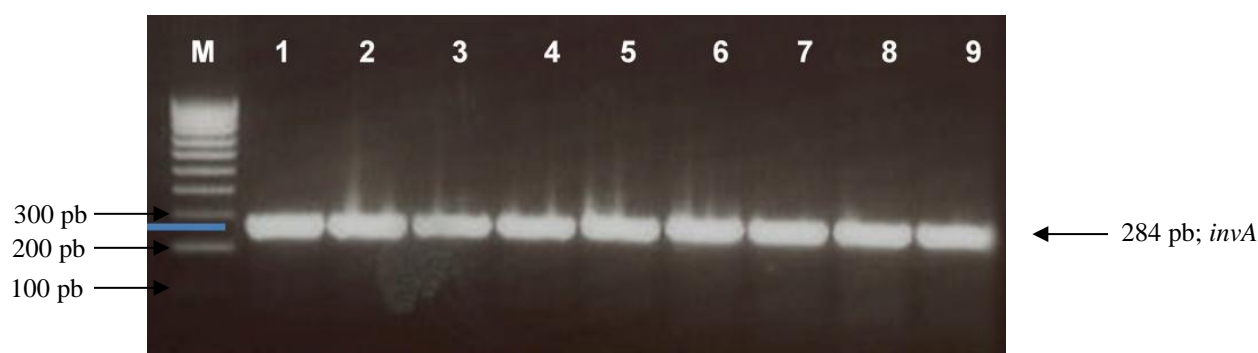


Figura 8. Análise de produtos de PCR do gene *invA* por electroforese em gel de agarose a 1 % (p/v). M: marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1: controlo positivo *S. enterica* ser. Typhimurium, 2-9- estirpes de *Salmonella* spp. em estudo.

3.6. Confirmação molecular de serovar Typhimurium e da sua variante monofásica O:1,4,[5],12:i:-

Os isolados classificados pela serotipificação como pertencentes ao grupo O:4,5 foram analisados utilizando uma adaptação do adaptado PCR multiplex recomendado pela EFSA (EFSA, 2010), o qual permite identificar o serovar Typhimurium e a sua variante monofásica O:1,4,[5],12:i:-. A região intergénica *fliB-fliA* e o gene *fliB* foram testados em separado. Os programas de amplificação e “primers” utilizados encontram-se descritos na (Tabela 7). Cada reação de PCR foi preparada num volume final de 50 µl, composta por 3 µl de DNA total da amostra, 10 pmol dos oligonucleótidos FFLIB e

RFLIA (região intergénica *fliB-fliA*) ou Sense 59 e Antisense 83 (*fljB*), 2 U de Taq DNA polimerase (5U/μl) (MB00101-NZYTech, Lisboa, Portugal), 10 μl de tampão de reação (5X, NZYTech), 3,5 mM de MgCl₂ (25 mM), 0,2 mM de dNTPs (25 mM) e água MilliQ necessária para perfazer o volume final. Todas as reacções foram efectuadas num termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf). Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1% (p/v), contendo 0,5 mg/L de brometo de etídeo durante 60 min a 80V. Os géis de agarose foram observados e fotografados pelo software ChemiDoc™ Gel Imaging System (XRS-BioRad).

Tabela 7. Programas de amplificação e oligonucleótidos utilizados para confirmação de serovar *S. enterica* ser. Typhimurium e variante monofásica O:1,4,[5],12:i:-.

Gene	Programa de amplificação	Sequência nucleotídica “primers” (5’-3’)	Amplificação (pb)	Referência
<i>fliB-fliA</i>	94 °C – 2 min	FFLIB: CTGGCGACGATCTGCGATG RFLIA: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	1000* 250**	Echeita, Herrera & Usera, 2001
	94 °C – 30 seg			
	55 °C – 30 seg			
	72 °C – 1 min			
	72 °C – 10 min			
<i>fljB</i>	95 °C – 2 min	Sense 59: CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG Antisense 83: GCCATATTTTCAGCCTCTCGCCCG	1389	Vanegas & Joys, 1995
	95 °C – 30 seg			
	64 °C – 30 seg			
	72 °C – 90 seg			
	72 °C – 10 min			

Amplificação da região intergénica em *S. enterica* ser. Typhimurium e variante monofásica O:1,4,[5],12:i:- (*) ou em outros serovares de *S. enterica* (**).

3.7. Tipificação molecular

3.7.1. Electroforese em campo pulsado (PFGE)

O protocolo de PFGE utilizado foi adaptado de Hunter *et al.* (2005). Em resumo, cada isolado de *Salmonella* foi incubado em placa de agar-sangue durante a noite a 37°C. Foi preparada uma suspensão celular em tampão CSB (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0) a uma densidade óptica a 610 nm (DO₆₁₀) equivalente a 1,2. A uma alíquota de 200 μl de suspensão celular ajustada foi adicionado 25 μl de proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) a 20 mg/ml. A mistura foi equilibrada a 42°C e posteriormente incorporada em “plugs” com 1% de agarose (SeaKem GTG Agarose,

Cambrex, Rockland, EUA) preparada em tampão TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) suplementado com 1% Dodecil sulfato de sódio (SDS), e também previamente equilibrada a 42°C. Os “plugs” foram refrigerados 5 min a -20°C, seguidos de 20 min a 4°C. Os “plugs” foram depois transferidos para um tubo contendo 3 ml de tampão de lise (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sarcosyl) e a lise das células foi efetuada durante um período de incubação a 37°C de 2 a 3 horas. Após a lise celular completa, os “plugs” foram lavados, a 37°C durante 5 min, três vezes com 12 ml de água destilada autoclavada, seguido de cinco lavagens, nas mesmas condições, com 12 ml de tampão TE. Os “plugs” foram mantidos a 4°C até à sua utilização.

Foi seleccionado um “plug” de cada isolado e uma porção (≈ 2 mm) deste excisada com um escalpe limpo e transferida para um tubo novo contendo 100 μ l de 1X tampão da enzima de restrição *Xba*I (Thermo Fisher Scientific, Wyman, EUA) e equilibrado durante 5 min a 37°C. O tampão foi removido e, de seguida, adicionados 200 μ l de 1X tampão de *Xba*I e 50 U de enzima *Xba*I (Thermo Fisher Scientific, Wyman, EUA). A macrorestrição do DNA foi efectuada com um tempo de contacto de 3 horas a 37°C. A eletroforese em campo pulsado foi efectuada num sistema CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, San Diego, EUA), num ângulo de 120°, com um bloco com “switch time” crescente de 1s a 15s durante 7 horas a 6 V/cm, seguido de um bloco com “switch time” crescente de 15s a 35s durante 13 horas a 6 V/cm. Como marcador de referência utilizou-se a estirpe *S. enterica* ser. Braenderup (H9812) (Hunter, *et al.*, 2005). Os perfis de macrorestrição obtidos após coloração do gel com brometo de etídeo a 0,5 mg/l foram processados no programa *BioNumerics* v. 7.6 (Applied Math, Ghent, Belgica) e analisados segundo o método de agrupamentos pelas médias aritméticas não ponderadas (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*- UPGMA), utilizando o coeficiente de semelhança de Dice. A definição de grupo clonal e subgrupo clonal foi efectuada de acordo com os critérios de Carriço, *et al.* (2005), considerando-se do mesmo grupo clonal isolados semelhantes em pelo menos 80%, com tolerância de posição das bandas de 1.7%, e do mesmo subgrupo clonal quando semelhantes em pelo menos 97%.

3.7.2. “Multilocus sequence typing” (MLST)

A técnica de tipificação molecular por MLST foi aplicada a todos os isolados *S. enterica* ser. Typhi e a isolados de outros serovares representativos dos grupos clonais obtidos por PFGE. Fragmentos internos de sete genes “housekeeping”, *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA*, foram amplificados e sequenciados com os oligonucleótidos disponíveis na base de dados pública EnteroBase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>). Os oligonucleótidos e programas de amplificação usados encontram-se detalhados na (Tabela 8). Cada reação de PCR foi preparada num volume final de 25 µl, composta por 3 µl de DNA total da amostra, 20 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq DNA polimerase (ThermoFisher), 1X tampão da Taq DNA Polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e água MilliQ necessária para perfazer o volume final. Todas as reacções foram efectuadas num termociclador Eppendorf Mastercycler. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1% (p/v), contendo 0,25 mg/L de brometo de etídeo durante 45 min a 80V. Os géis de agarose foram observados e fotografados num sistema gel-Doc XR (BioRad).

As sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação (STAB-Vida) foram analisadas e editadas utilizando o software MEGA v6, sendo posteriormente submetidas à base de dados EnteroBase para obter o perfil alélico de cada gene e o “sequence type” (ST) de cada isolado.

Tabela 8. Lista de oligonucleótidos e programas de amplificação utilizados para MLST.

Gene	Programa de amplificação	Sequência (5' – 3')	Amplicação (pb)	Referência
<i>dnaN</i>		dnaN_sF: CCGATTCTCGGTAACCTGCT dnaN_sR1: ACGCGACGGTAATCCGGG	659	EnteroBase
<i>hemD</i>	95 °C – 3 min	hemD_sF2: GCCTGGAGTTTTCCTACTG hemD_sR : GACCAATAGCCGACAGCGTAG	564	EnteroBase
<i>hisD</i>	95 °C – 45 seg 50 °C – 45 seg 72 °C – 45 seg	hisD_sF: GTCGGTCTGTATATCCCGG hisD_sR: GGTAATCGCATCCACCAAATC	651	EnteroBase
<i>purE</i>	72 °C – 5 min	purE_sF1: ACAGGAGTTTTAAGACGCATG purE_sR1: GCAAACCTTGCTTCATAGCG	539	EnteroBase
<i>sucA</i>		sucA_sF1: CCGAAGAGAAACGCTGGATC sucA_sR: GGTTGTTGATAACGATACGTAC	639	EnteroBase
<i>thrA</i>	95 °C – 3 min 95 °C – 1 min	thrA_sF: ATCCCGGCCGATCACATGAT thrA_sR1: ACCGCCAGCGGCTCCAGCA	641	EnteroBase
<i>aroC</i>	55 °C – 1 min 72 °C – 1 min 72 °C – 5 min	35x aroC_F: CCTGGCACCTCGCGCTATAC aroC_R: CCACACACGGATCGTGGCG	826	EnteroBase

3.7.3 Identificação do haplótipo H58 de *S. enterica* ser. Typhi

Os isolados *S. enterica* ser. Typhi foram submetidos a uma abordagem baseada em PCR para identificação do haplótipo H58, disseminado globalmente e associado frequentemente a fenótipos de multiresistência (Wong, *et al.*, 2015). A abordagem baseia-se na presença de uma deleção genômica específica de estirpes pertencentes ao haplótipo H58 (Murgia, *et al.*, 2016). Os oligonucleótidos e programa de amplificação usados encontram-se descritos nas (Tabela 9). Cada reação de PCR foi preparada num volume final de 25 µl, composta por 3 µl de DNA total da amostra, 20 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq DNA polimerase (ThermoFisher), 1X tampão da Taq DNA Polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e água MilliQ necessária para perfazer o volume final. Todas as reacções foram efectuadas num termociclador Eppendorf Mastercycler. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1% (p/v), contendo 0,25 mg/L de brometo de etídeo durante 45 min a 80V. Os géis de agarose foram observados e fotografados num sistema gel-Doc XR (BioRad).

Tabela 9. Lista de oligonucleótidos e programa de amplificação utilizado para identificação do haplótipo H58.

Alvo	Programa de amplificação	Sequência (5' – 3')	Ampliação (pb)	Referência
H58	95 °C – 3 min	H58 F:	1100 (não-H58) 107 (H58)	Murgia, 2016
	95 °C – 1 min	GCAGGCAAAATCGAAATCAG		
	60 °C – 1 min	H58 R: CAAACCGTTGAATCGGAAGT		
	72 °C – 1 min			
	72 °C – 5 min			

3. 8 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os fenótipos de susceptibilidade aos antimicrobianos foram avaliados por determinação de concentração mínima inibitória (CMIs) fazendo uso do sistema de microdiluição comercial - *Microdilution System MicroScan*®- Neg MIC panel Type 44 (Siemens Healthcare Diagnostics, West Sacramento, CA, USA). Os valores de CMI para a ciprofloxacina foram determinados pelo método de *E-Test* (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) em placas de agar Mueller-Hinton (Oxoid). A CMI foi considerada como a menor concentração de antimicrobiano à qual não ocorreu crescimento visível. A interpretação da susceptibilidade fenotípica aos antimicrobianos foi feita de acordo com as recomendações de *Clinical and Laboratory Standards Institute* M100-S26 (CLSI, 2016), classificando os isolados como susceptível (S), susceptível intermédio (SI) e resistente (R). Neste trabalho, todos os isolados categorizados como susceptíveis intermédios (SI) foram considerados como resistentes.

3. 9. Detecção de determinantes de resistência a antimicrobianos

Para a detecção de genes de resistência associados aos antibióticos em estudo foi utilizada a técnica de PCR com adaptação e implementação de vários protocolos. O aparelho usado em todos os protocolos foi o termociclador Eppendorf Mastercycler. A Tabela 10 detalha os oligonucleótidos utilizados neste trabalho.

Ao longo deste trabalho foi pesquisada a presença de determinantes de resistência aos beta-lactâmicos (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CMY}, *bla*_{LAT}, *bla*_{ACT}, *bla*_{MIR}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX} e *bla*_{DHA} [*pAmpC*]), ao trimetoprim-sulfametoxazole (*sul1*, *sul2*, *sul3*, *dfrA1* e *dfrA12*), aos fenicóis (*cmlA* e *floR*), e às fluoroquinolonas (*aac(6)-Ib*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*,

qnrD e *qnrS*). Para a resistência às fluoroquinolonas foram ainda amplificados fragmentos internos dos genes *gyrA/B* e *parC/E*, os quais foram sequenciados usando o mesmo par de oligonucleótidos (tabela 10). As sequências nucleotídicas foram analisadas utilizando o software MEGA v6.

Para amplificação dos fragmentos internos dos genes *aac(6)-Ib*, *blaCTX-M* e *pAmpC* foi usada a Supreme NZYTaq 2X Green Master Mix (NZYTech), a qual inclui 0,2 U/ µl de Taq Polimerase e 2.5 mM MgCl₂. O PCR simplex do gene *blaCTX-M* foi ainda efectuado num volume final de 50 µl usando 20 pmol de cada oligonucleótido (tabela 10) (Robicsek *et al.*, 2006; Eldestein *et al.*, 2003; Pérez & Hanson, 2002) . Foi realizado o multiplex PCR para amplificação de *blaTEM*, *blaSHV* e *blaOXA-1* de acordo com Pomba *et al.*, 2006, num volume final de 50 µl, contendo 2 ul de DNA total, 10 pmol de cada oligonucleótido, 1,5 U de Taq DNA polimerase (5U/µl) (MB00101-NZYTech), 10 ul de tampão de reação (5X, NZYTech), 3,0 mM de MgCl₂ (25 mM), 0,2 mM de dNTPs (25 mM) e água MilliQ para perfazer volume de reacção.

O multiplex para amplificação de *qnrA/B/S/C/D* foi efectuado de acordo com Cattoir, 2009 para um volume final de 25 ul, contendo 3 µl de DNA total, 10 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq DNA polimerase (5U/µl) (MB00101-NZYTech), 10 ul de tampão de reação (5X, NZYTech), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e água MilliQ para perfazer volume final (tabela 10).

Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (NZYTech) a uma concentração apropriada para análise do(s) amplicão(ões) a obter, usando tris-borato-EDTA (TBE) 0.5x ou tris-acetato-EDTA (TAE) 1x. Os géis foram visualizados através de transiluminação por UV (Thermal Imaging System FTI-500, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA). A cada corrida adicionou-se um marcador de peso molecular, escolhido consoante a gama de pesos moleculares abrangida: 100-1000 pb, NZYDNA Ladder V (NZYTech); 100-10.000 pb, NZYDNA Ladder III, (NZYTech).

Tabela 10. Programas de amplificação e oligonucleótidos utilizados na detecção de determinantes de resistência a antimicrobianos.

Gene	Oligonucleótido	Sequência (5' - 3')	Amplicação (pb)	Referência
<i>bla_{TEM}</i>	P1	TACGATACGGGAGGGCTTAC	716	Pomba <i>et al</i> , 2006
	P2	TTCCTGTTTTTGCTCACCCA		
<i>bla_{SHV}</i>	shvf1	TCAGCGAAAAACACCTTG	471	Pomba <i>et al</i> , 2006
	shvr	TCCCGCAGATAAATCACCA		
<i>bla_{OXA-1}</i>	oxa1f	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	199	Pomba, <i>et al</i> 2006
	oxa1r	CGCATCAAATGCCATAAGTG		
<i>bla_{CTX-M}</i>	ctxf	TTTGCGATGTGCCAGTACCAGTAA	544	Edelstein <i>et al</i> , 2003
	ctxr	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
<i>bla_{CIT}</i>	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	Pérez & Hanson, 2002
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
<i>bla_{ACC}</i>	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	Pérez & Hanson, 2002
	ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
<i>bla_{MIR}</i>	EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302	Pérez & Hanson, 2002
	EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		
<i>bla_{FOX}</i>	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	Pérez & Hanson, 2002
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
<i>bla_{MOX}</i>	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	Pérez & Hanson, 2002
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
<i>bla_{DHA}</i>	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	Pérez & Hanson, 2002
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
<i>sul1</i>	Sul1f	TGGTGACGGTGTTCGGCATTC	769	Mazel, <i>et al.</i> , 2000
	Sul1r	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG		
<i>sul2</i>	Sul2f	CGGCATCGTCAACATAAC	722	Maynard, <i>et al.</i> 2003
	Sul2r	GTGTGCGGATGAAGTCAG		
<i>sul3</i>	Sul3f	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	900	Perreten, & Boerlin 2003
	Sul3r	CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA		
<i>dfrA1</i>	DfrIaf	GTGAACTATCACTAATGG	474	Navia, <i>et al.</i> , 2003
	DfrIar	TTAACCCTTTTGCCAGATTT		
<i>dfrA12</i>	Dfra12f	GGTGSGCAGAAGATTTTTTCGC	462	Guerra <i>at al</i> , 2001
	Dfra12r	TGGGAAGAAGGCGTCACCCTC		
<i>cmlA</i>	CmlA-F	TGTCATTTACGGCATACTCG	455	Sáenz, <i>et al.</i> , 2004
	CmlA-R	ATCAGGCATCCCATTCCCAT		

Tabela 10. Continuação.

Gene	Oligonucleótido	Sequência (5' - 3')	Amplificação (pb)	Referência
<i>floR</i>	FloR1	CACGTTGAGCCTCTATAT	868	Sáenz, 2004
	FloR2	ATGCAGAAGTAGAACGCG		
<i>qnrA</i>	QnrFMVF	CGTCTGTCTTTGGCCAACTT	225	Cattoir, 2009
	QnrFMVR	TGACTTCAGCCACTGTCAGC		
<i>qnrB</i>	QnrBFQ1	ATGACGCCATTACTGTATAA	562	Cattoir, 2009
	QnrBFQ2	GATCGCAATGTGTGAAGTTT		
<i>qnrS</i>	qnrSf	ACGACATTCGTCAACTGCAA	417	Cattoir, 2009
	qnrSr	TAAATTGGCACCCTGTAGGC		
<i>qnrC</i>	qnrC fw	GGGTTGTACATTTATTGAATC	447	Wang, 2009
	qnrC rv	TCCACTTTACGAGGTTCT		
<i>qnrD</i>	qnrD fw	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	582	Cavaco, 2009
	qnrD rv	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
<i>gyrA</i>	gyrA_f	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC	347	Chau, 2007
	gyrA_r	TACCGTCATAGTTATCCACG		Este estudo
<i>gyrB</i>	gyrB_f	CAAACCTGGCGGATTGTCAGG	346	Este estudo
	gyrB_r	TTCCGGCATCTGACGATAGA		Chau, 2007
<i>parC</i>	parC_f	CTATGCGATGTCAGAGCTGG	262	Chau, 2007
	parC_r	TAACAGCAGCTCGGCGTATT		
<i>parE</i>	parE_f	TCTCTTCCGATGAAGTGCTG	238	Chau, 2007
	parE_r	ATACGGTATAGCGGCGGTAG		
	tetAr	CTGCCTGGACAACATTGCTT		
	tetBr	CTAAGCACTTGTCTCCTGTT		
	aadAr	ATCCTTCGGCGCGATTTTG		
	aacC4r	TCATCTCGTTCTCCGCTCAT		
<i>aac(6)-Ib</i>	aaC6lbf1	ATATGCGGATCCAATGAGCAAC GCAAAAACAAAGTTAG	624	Robicsek <i>et al.</i> , 2006
	aaC6lbr1	ATATGCGAATTCTTAGGCATCA CTGCGTGTTGCTC		

Os vários programas de amplificação usados encontram-se detalhados na Tabela 11.

Tabela 11. Programas de amplificação usados ao longo do trabalho para detecção de genes de resistência aos antimicrobianos.

Programa de amplificação	Gene	Programa de amplificação	Gene
94 °C – 7 min 94 °C – 1 min 57 °C – 2 min 72 °C – 1 min 72 °C – 10 min	<i>bla</i> _{CTX-M}	94 °C – 3 min 94 °C – 1 min 61 °C – 30 seg 72 °C – 1 min 72 °C – 7 min	<i>aac(6)-Ib</i>
94 °C – 7 min 61 °C – 5 min 72 °C – 1 min 94 °C – 1 min 61 °C – 2 min 72 °C – 5 min	Multiplex <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-1} <i>sul1</i>	94 °C – 2 min 94 °C – 1 min 50 °C – 1 min 72 °C – 1 min 72 °C – 10 min	<i>sul2</i>
94 °C – 5 min 94 °C – 1 min 51 °C – 1 min 72 °C – 1 min 72 °C – 10 min	<i>sul3</i>	94 °C – 2 min 94 °C – 30 seg 55 °C – 30 seg 72 °C – 1 min 72 °C – 10 min	<i>dfrA1</i>
95 °C – 2 min 95 °C – 30 seg 58 °C – 30 seg 72 °C – 1 min 72 °C – 10 min	Multiplex <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>	95 °C – 5 min 95 °C – 30 seg 53 °C – 30 seg 72 °C – 1 min 72 °C – 10 min	Multiplex <i>qnrC</i> , <i>qnrD</i>
95 °C – 3 min 95 °C – 1 min 52 °C – 1 min 72 °C – 1 min 72 °C – 5 min	<i>gyrA/B</i> <i>parC/E</i>		

3. 10 Análise Estatística

Para realização do tratamento estatístico foi usado o programa informático Statistical Analysis System (SAS) (Versão 9.4; SAS Institute INC, NC, USA). Foi determinada a frequência de *Salmonella* nos diferentes municípios de Luanda, por tipo de amostra (Fezes, frango, peixe, fuba de mandioca (farinha de mandioca) e águas residuais). Foi determinada a frequência dos diferentes serogrupos por município e tipos de amostra (Fezes, frango, peixe, fuba de mandioca (farinha de mandioca) e águas residuais). Para realizar a comparação de proporções de modo a perceber-se em termos estatísticos qual a fonte de infecção por *Salmonella*, foi realizado o Fisher's Exact Test (two tailed). Para todas as avaliações foram considerados valores significativos de $p < 0.05$.

4. Resultados

O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento epidemiológico-laboratorial para a caracterização microbiológica, fenotípica e molecular das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas em amostras clínicas, alimentares e de águas residuais na região de Luanda durante o período de agosto de 2013 a novembro de 2015. Um total de 290 amostras foram colhidas neste período, sendo 150 amostras clínicas, 90 de alimentos e 50 ambientais/águas residuais, para a caracterização laboratorial de *Salmonella* spp. Destas 290 amostras conseguiu-se completar o estudo epidemiológico-laboratorial num total de 65 amostras. As restantes 225 ou foram negativas para *Salmonella* spp. ou as limitações laboratoriais vividas em Angola limitaram grandemente a obtenção de isolados viáveis.

4.1 - *Salmonella enterica* ser. Typhi

Das 65 *Salmonella* spp. Isoladas verificou-se que 10 estirpes correspondiam a *Salmonella enterica subsp. enterica* ser. Typhi. Estas foram todas isoladas a partir de amostras clínicas de pacientes com suspeita de febre tifóide ou doença entérica. Este grupo de amostras tem um período de colheita de setembro de 2013 a maio de 2014, pois entre junho de 2014 e novembro de 2015 as colheitas focaram-se em amostras de alimentos e ambientais (Tabela 12).

Tabela 12. Dados clínicos, tratamento e evolução dos pacientes diagnosticados com a infecção por *S. enterica* ser. Typhi em Luanda, Angola, no período 2013-2014.

Isolado	Origem do paciente	Tipo de amostra	Idade	Sexo	Diagnóstico clínico	Tratamento	Evolução da doença
2	Ingombota	Sangue	17	M	Febre (8 dias)	Clindamicina, quinino	Sobreviveu
3	Ingombota	Sangue	34	M	Sem dados	Sem dados	Sem dados
18	Ingombota	Sangue	16	M	Febre, dor abdominal	Ciprofloxacina	Sobreviveu
19	Ingombota	Sangue	69	F	Astenia, distúrbio mental	Ciprofloxacina, Ceftriaxona	Faleceu
26	Belas	Sangue	11	F	Febre, convulsões	Ciprofloxacina, Ceftriaxona	Sobreviveu
27	Rangel	Sangue	16	F	Febre, dor abdominal	Ciprofloxcin	Sobreviveu
28	Cacuaco	Sangue	38	M	Febre, dor abdominal	Ciprofloxacina	Sobreviveu
29	Ingombota	Sangue	11	M	Febre	Não tratado	Desconhecido
32	Maianga	Fezes	14	F	Febre, dor abdominal	Ciprofloxacina	Sobreviveu
34	Maianga	Fezes	20	F	Dor abdominal	Ácido nalidíxico	Sobreviveu

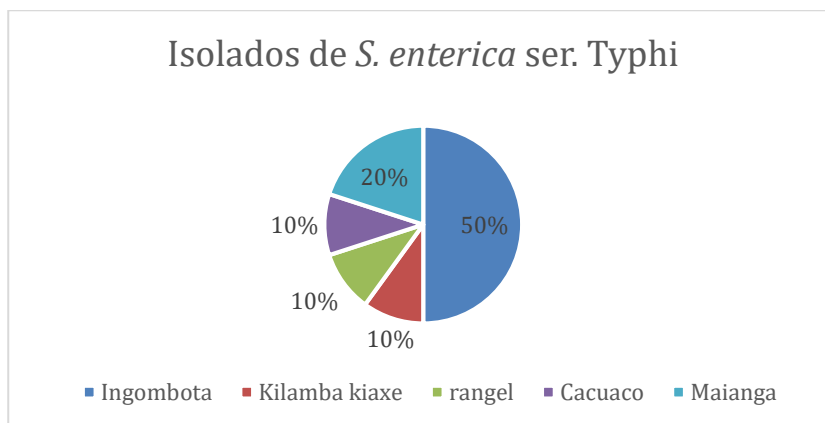


Figura 9. Distribuição em percentagem dos dez isolados de *S. enterica* ser. Typhi segundo a origem geográfica dos pacientes.

Todos os isolados foram submetidos a testes bioquímicos para a identificação da espécie (API 20E System (BioMérieux, France) e todos apresentaram o perfil característico de *S. enterica* ser. Typhi (Figura10). Foi realizada a identificação sorológica em todos isolados. Nos 10 isolados de *S. enterica* ser. Typhi houve aglutinação dos antígenos somático (OD1) e flagelar (Hd), assim como no antissoro (Vi) para a caracterização do antígeno do envoltório, confirmando-se assim a identificação bioquímica. Os dez isolados foram caracterizados em relação aos padrões de resistência aos antimicrobianos e clonalidade.

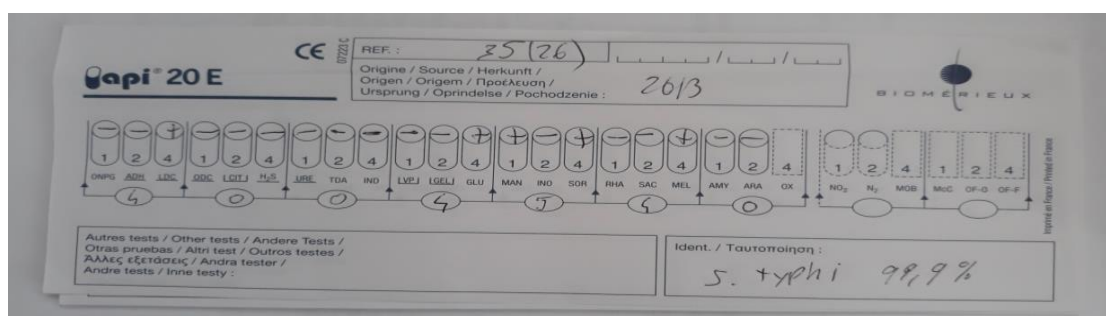


Figura 10. Perfil bioquímico característico de *S. enterica* ser. Typhi obtido pelo sistema API 20 E (Biomérieux).

4.1.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos dez isolados de *S. enterica* ser. Typhi encontram-se descritos nas Tabelas 13, 14 e 15. Apenas dois isolados mostraram ser susceptíveis a todos os antibióticos testados. O padrão de resistência mais comum observado foi ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina e trimetoprim-sulfametoxazole, exibido em 3 dos 10 isolados (Tabela 13). Dois isolados apresentaram, adicionalmente, resistência à cefuroxima. Um isolado apresentou resistência ao cloranfenicol e ao trimetoprim-sulfametoxazole, enquanto dois isolados apresentaram susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina. Nenhum dos isolados apresentou um fenótipo de multiresistência, caracterizado pela resistência ao cloranfenicol, ampicilina e trimetoprim-sulfametoxazole (Anjum *et al.*, 2011). Não foi detectada qualquer resistência a tetraciclina, aminoglicosídeos, nitrofurantoína, colistina ou fosfomicina entre os dez isolados de *S. enterica* ser. Typhi em estudo.

No geral, observou-se uma maior frequência de resistência ao trimetoprim-sulfametoxazole, tendo sido detectada em 6 dos 10 isolados. Entre os diversos genes pesquisados associados à resistência a estes antibióticos, apenas o gene *sulI* foi detectado nestes 6 isolados. Relativamente aos antibióticos beta-lactâmicos, cinco isolados apresentaram um fenótipo de resistência. Contudo, nenhum dos genes pesquisados foi detectado. A resistência ao cloranfenicol foi observada em apenas um isolado. Todavia, nenhum dos genes de resistência pesquisados, *cmlA* e *floR*, foi detectado. A susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina foi encontrada em dois isolados, um dos quais apresentou a mutação *S83Y* em *GyrA*, enquanto o restante apresentou a mutação *S464F* em *GyrB*. Foi ainda pesquisada a presença do gene *aac(6')-Ib* associado à resistência a aminoglicosídeos mas também a fluoroquinolonas (Al-Gallas N, *et al.*, 2013). No entanto, este não foi detectado em nenhum dos dois isolados (Figura 11).

Tabela 13. Padrões de resistência a antibióticos encontrados nos dez isolados de *S. enterica* ser. Typhi, de acordo com as recomendações CLSI (2016).

Padrões de Resistência	Nº de isolados
AMP, A/S, PI, SXT	3
AMP, A/S, CXM, PI, SXT	2
CIP	2
C, SXT	1
Susceptível	2

AMP: ampicilina; A/S: ampicilina/sulbactam; PI: piperacilina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole; CXM: cefuroxima; CIP: ciprofloxacina; C: cloranfenicol.

Tabela 14. Valores de CMI (mg/L) de antibióticos beta-lactâmicos para os dez isolados de *Salmonella enterica* ser. Typhi em estudo.

Isolado	CMI (mg/L)																	
	AMP	AMC	A/S	AZT	CTX	CTX/CA	CEF	CXM	CAZ	CAZ/CA	CPE	CFX	PI	PI/T	DOR	IMP	MER	ERT
2	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 4	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
3	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 4	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
18	> 16	≤ 8/4	> 16/8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	> 64	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
19	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 4	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
26	> 16	≤ 8/4	> 16/8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 4	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	> 64	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
27	> 16	≤ 8/4	> 16/8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	> 64	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
28	> 16	≤ 8/4	> 16/8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	16	≤ 4	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	> 64	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
29	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 4	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
32	> 16	≤ 8/4	16/8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 4	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	> 64	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
34	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 4	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; A/S: ampicilina-sulbactam; AZT: aztreonam; CTX: cefotaxima; CTX/CA: cefotaxima-ácido clavulânico; CEF: cefalotina; CXM: cefuroxima; CAZ: ceftazidima; CAZ/CA: ceftazidima-ácido clavulânico; CPE: cefepima; CFX: ceftaxina; PI: piperacilina; PI/T: piperacilina-tazobactam; DOR: doripenem; IMP: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Não existem “breakpoints” definidos para os antibióticos CTX/CA, CEF e CAZ/CA.

Tabela 15. Valores de CMI (mg/L) de vários antibióticos para os dez isolados de *Salmonella enterica* ser. Typhi em estudo.

Isolate	CMI (mg/L)														
	NA	CIP*	LEV	NOR	NIT	C	SXT	TE	MIN	TGC	COL	FOS	AMK	GEN	TOB
2	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
3	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	> 16	4/76	≤ 4	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
18	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	4/76	≤ 4	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
19	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 4	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
26	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	4/76	≤ 4	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
27	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	4/76	≤ 4	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
28	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	4/76	≤ 4	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
29	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 4	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
32	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	4/76	≤ 4	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
34	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 4	≤ 4	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2

NA: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; NOR: norfloxacina; NIT: nitrofurantóina; C: cloranfenicol; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole; TE: tetraciclina; MIN: minociclina; TGC: tigeciclina; COL: colistina; FOS: fosfomicina; AMK: amicacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Não existem “breakpoints” definidos para os antibióticos TGC e COL.

*Os valores de CMI para a ciprofloxacina foram adicionalmente determinados por E-test para testar a presença de susceptibilidade reduzida a esta fluoroquinolona (dados apresentados na **Figura 11**).

4.1.2 Tipagem molecular das *S. enterica* ser. Typhi

A tipagem molecular por *Xba*I-PFGE das 10 isolados de *S. enterica* ser. Typhi discriminou três pulsotipos (A, B e C), em que o pulsotipo A composto por oito dos isolados em estudo agrupados em cinco subtipos, A1 a A5 (Figura 11). À semelhança, três diferentes sequências tipo (ST) foram identificadas com base no esquema de tipagem por MLST, corroborando a tipagem por *Xba*I-PFGE. Todos os oito isolados do pulsotipo A pertencem ao ST2, enquanto ST1 e ST8 foram representadas por um único isolado cada, pertencentes aos pulsotipos C e B, respectivamente (Figura 11). Estes três STs são variáveis de um único *locus* (SLVs) entre si e estão englobados no complexo clonal, CC13, demonstrando que todos os dez isolados de *S. enterica* ser. Typhi estão intimamente relacionados. Em realce, sete dos isolados apresentando fenótipos de resistência pertencem ao pulsotipo A/ST2.

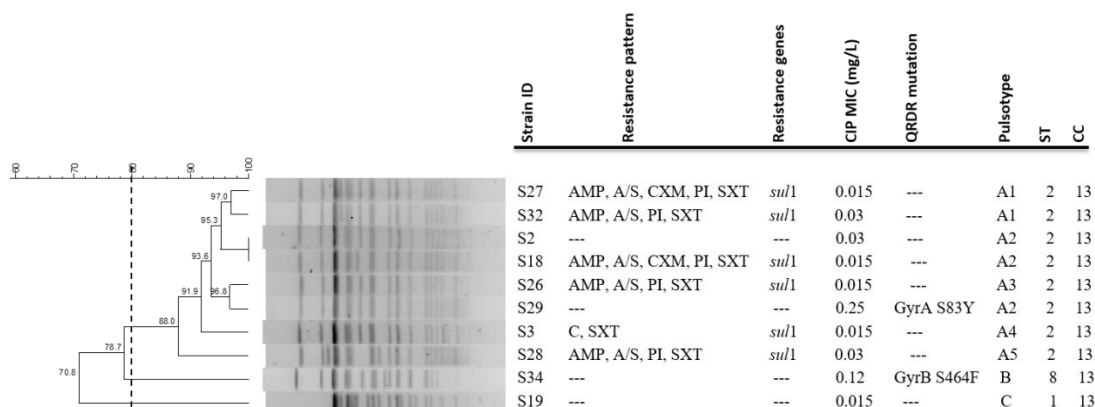


Figura 11. Relação clonal dos dez isolados de *S. enterica* ser. Typhi e a correlação com os padrões de resistência antimicrobiana e os determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos. Os isolados foram considerados como pertencentes ao mesmo pulsotipo quando apresentarem valores de semelhança $\geq 80\%$ (linha a tracejado) e ao mesmo subtipo quando esses valores eram $\geq 97\%$. AMP: ampicilina; A/S: ampicilina-sulbactam; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole; C: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacina; ST: sequência tipo; CC: complexo clonal.

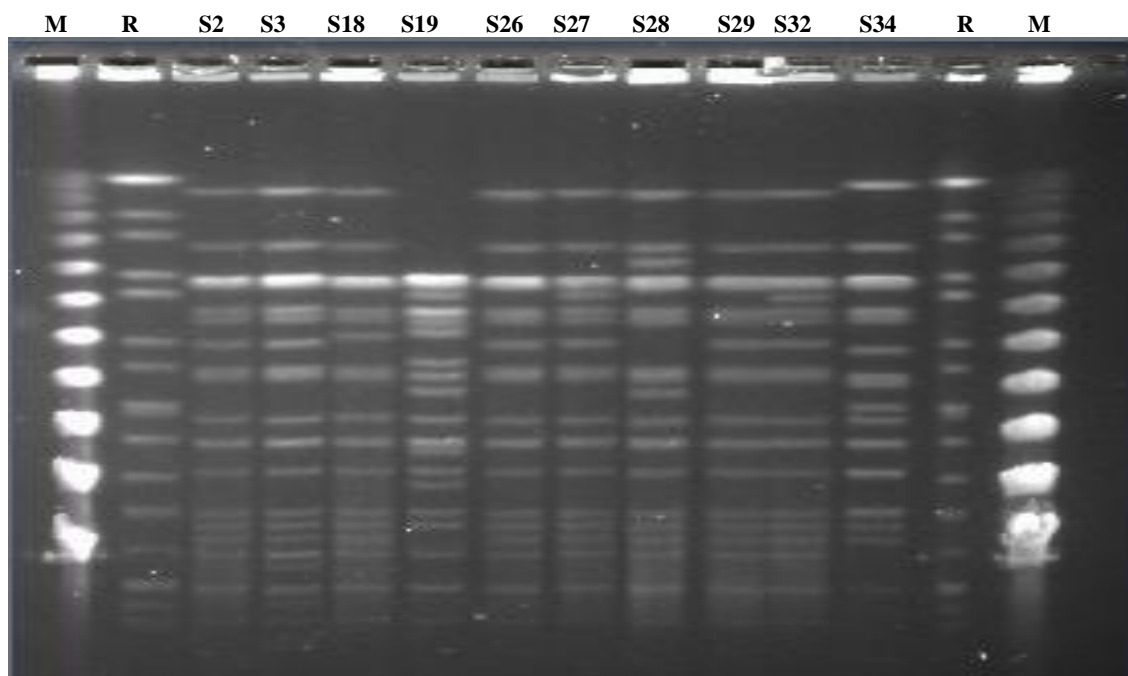


Figura 12. Caracterização molecular por *XbaI*-PFGE das 10 estirpes de *S. enterica* ser. Typhi. M-Marcador lambda PFG (New England biolabs) R- *S. enterica* ser. Braenderup (H9812).

4.2 *S. enterica* não Typhi

Recordando que um total de 290 amostras foram colhidas entre Agosto de 2013 a Novembro de 2015 na região de Luanda – Angola, sendo 150 amostras clínicas, 90 de alimentos e 50 ambientais/águas residuais, para a pesquisa laboratorial de *Salmonella* spp. Os isolados obtidos foram identificados pelos métodos fenotípicos descritos na secção dos Material e Métodos, nomeadamente pelos ensaios bioquímicos-galeria API 20E, ensaios serológicos para a identificação do serovar. A confirmação do género e a presença de genes foi feita por amplificação por PCR do gene *invA* (Figura 8). Todos os isolados classificados como *Salmonella* spp. foram sujeitos a testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e à detecção por PCR de determinantes de resistência. Por fim, foi feita a tipagem molecular por *XbaI*-PFGE para todos os isolados e por MLST para isolados representativos de cada um dos pulsotipo identificados por *XbaI*-PFGE.

Do total das 290 amostras biológicas processadas, foram identificados 55 isolados como *S. enterica* não Typhi, sendo 32 (32/55, 58%) de origem clínica; 13 (13/55, 22.4%) de origem ambiental e 10 (10/55, 18.18%) de origem alimentar. A serotipificação revelou

que o serovar Enteritidis foi o mais frequente, sendo detectado em 17 dos 55 isolados (17/55, 30.9%), dos quais, 9 (9/17, 52.9%) eram de origem clínica, 3 (3/17, 17.6 %) de origem alimentar e 5 (5/17, 29.4%) de águas residuais. O serovar Typhimurium foi identificado em 12 isolados (12/55, 21.8 %), sendo 3 (3/12, 25 %) de origem clínica, 4 (4/12, 33.3 %) de origem alimentar e 5 (5/12, 41.6 %) de amostras ambientais. A variante monofásica deste serovar, 4[5],12:i:- foi detectada em 21 isolados (21/55, 38.1%), sendo 18 (18/21, 85.7 %) de amostras clínicas, 2 (2/21, 9.5%) de alimentos e 1 (1/21, 0.47%) de amostras ambientais. Por fim, para 5 isolados (5/55, 9.0%) não foi possível identificar o serovar, dos quais 2 (2/5, 40 %) de origem clínica, 1 (1/5, 20 %) de origem alimentar e 2 (2/5, 40 %) de amostras ambientais (Tabela 16 e 16a). A elevada prevalência de *S. enterica* ser. Typhimurium variante monofásica 4,[5],12:i:-, e a sua presença em alimentos e ambiente evidenciam a importância da epidemiologia molecular para o conhecimento da situação real do tipo de variantes que estão em circulação em Angola e seus canais de transmissão.

Tabela 16. Distribuição dos serovares dos 65 isolados de *Salmonella* spp. por tipo de amostra biológica.

Tipo de Amostra	Total	Typhi	Enteritidis	Typhimurium	O:1,4,[5],12:i:-	Não tipável
Fezes	34	2	9	3	18	2
Sangue	8	8	0	0	0	0
Peixe	6	0	3	2	1	0
Frango	3	0	0	2	1	0
Farinha	1	0	0	0	0	1
Águas residuais	13	0	5	5	1	2
TOTAL	65 (100%)	10 (15.3%)	17 (26.1%)	12 (18.4%)	21 (32.3%)	5 (7.6%)

Tabela 16a. Distribuição dos serovares dos 55 isolados de *S. enterica* não Typhi, segundo a origem biológica da amostra.

Serovar	Nº de Estirpes	Origem		
		Clínica	Alimentar	Ambiental
Enteritidis	17 (30.9%)	9 (52.9%)	3 (17.6%)	5 (29.4%)
Typhimurium	12 (21.8%)	3 (25 %)	4 (33.3%)	5 (41.6%)
4[5],12:i:-	21(38.1%)	18(85.7%)	2 (9.5%)	1 (0.47%)
Outros	5 (9.0 %)	2 (40 %)	1(20 %)	2(40 %)
Total	55 (100%)	32(58.1%)	10(18.1%)	13 23.6)

4.2.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade para um variado painel de antibióticos foi determinado para todos os 55 isolados (Tabelas 18, 20, 22 e 24). Em relação à resistência aos antimicrobianos, o padrão de resistência mais observado foi a resistência à colistina em 5 isolados (5/55, 9.0%). O segundo padrão de resistência mais frequente foi a resistência à ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazole, presente em 2 isolados (2/55, 3.6 %). Por fim, 1 isolado apresentou resistência à ampicilina, ampicilina/sulbactam, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazole; e 1 isolado apresentou resistência a ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina. A resistência a ampicilina e ampicilina/sulbactam foi observada respectivamente em 4 dos 55 isolados (7.27%).

A presença de gene *sulI* foi detectada em 3 isolados. Apenas 3 isolados (5.44%) apresentaram resistência ao cloranfenicol, no entanto os genes de resistência *cmlA* e *floR* não foram detectados. 3 isolados com determinante de resistência a beta-lactamase (*bla_{TEM}*) foram detectados nos isolados resistentes à ampicilina e a ampicilina/sulbactam e 1 isolado resistente a ampicilina/sulbactam foi detectado o gene de resistência (*bla_{TEM}*) que codifica para a B-lactamase TEM. Não foi detectada resistência às fluoroquinolonas nos isolados de *Salmonella* não Typhi (Tabela 25).

Tabela 17. Valores de CMI (mg/L) de antibióticos beta-lactâmicos para os isolados de *Salmonella enterica* ser. Enteritidis em estudo.

Isolado	CMI (mg/L)																	
	AMP	AMC	A/S	AZT	CTX	CTX/CA	CEF	CXM	CAZ	CAZ/CA	CPE	CFX	PI	PI/T	DOR	IMP	MER	ERT
1	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
4	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
5	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
8	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
11	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
16	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
24	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
43	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
45	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
53	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
67	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
77	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
78	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
79	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
80	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
89	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
93	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; A/S: ampicilina-sulbactam; AZT: aztreonam; CTX: cefotaxima; CTX/CA: cefotaxima-ácido clavulânico; CEF: cefalotina; CXM: cefuroxima; CAZ: ceftazidima; CAZ/CA: ceftazidima-ácido clavulânico; CPE: cefepima; CFX: ceftoxitina; PI: piperacilina; PI/T: piperacilina-tazobactam; DOR: doripenem; IMP: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Não existem “breakpoints” definidos para os antibióticos CTX/CA, CEF e CAZ/CA.

Tabela 18. Valores de CMI (mg/L) de vários antibióticos para os isolados de *Salmonella enterica* ser. Enteritidis em estudo.

Isolate	CMI (mg/L)														
	NA	CIP*	LEV	NOR	NIT	C	SXT	TE	MIN	TGC	COL	FOS	AMK	GEN	TOB
1	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
4	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
5	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
8	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
11	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
16	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
24	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
43	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	64	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	> 4	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
45	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	64	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	> 4	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
53	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	> 4	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
67	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	64	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	> 4	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
77	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
78	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	> 4	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
79	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
80	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
89	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
93	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2

NA: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; NOR: norfloxacina; NIT: nitrofurantoina; C: cloranfenicol; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole; TE: tetraciclina; MIN: minociclina; TGC: tigeciclina; COL: colistina; FOS: fosfomicina; AMK: amicacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Para os antibióticos TGC e COL foram usadas as recomendações EUCAST (2016). *Os valores de CMI para a ciprofloxacina foram adicionalmente determinados por microdiluição para testar a presença de susceptibilidade reduzida a esta fluoroquinolona.

Tabela 19. Valores de CMI (mg/L) de antibióticos beta-lactâmicos para os isolados de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium em estudo.

Isolado	CMI (mg/L)																	
	AMP	AMC	A/S	AZT	CTX	CTX/CA	CEF	CXM	CAZ	CAZ/CA	CPE	CFX	PI	PI/T	DOR	IMP	MER	ERT
30	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
31	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
35	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
37	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
38	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
52	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
75	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
81	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
83	> 16	≤ 8/4	> 16/8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	> 64	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
84	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
94	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
95	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; A/S: ampicilina-sulbactam; AZT: aztreonam; CTX: cefotaxima; CTX/CA: cefotaxima-ácido clavulânico; CEF: cefalotina; CXM: cefuroxima; CAZ: ceftazidima; CAZ/CA: ceftazidima-ácido clavulânico; CPE: cefepima; CFX: ceftaxitina; PI: piperacilina; PI/T: piperacilina-tazobactam; DOR: doripenem; IMP: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Não existem “breakpoints” definidos para os antibióticos CTX/CA, CEF e CAZ/CA.

Tabela 20. Valores de CMI (mg/L) de vários antibióticos para os isolados de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium em estudo.

Isolate	CMI (mg/L)														
	NA	CIP*	LEV	NOR	NIT	C	SXT	TE	MIN	TGC	COL	FOS	AMK	GEN	TOB
30	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
31	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
35	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
37	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
38	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
52	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
75	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	4	32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
81	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
83	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
84	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
94	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
95	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2

NA: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; NOR: norfloxacina; NIT: nitrofurantoína; C: cloranfenicol; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole; TE: tetraciclina; MIN: minociclina; TGC: tigeciclina; COL: colistina; FOS: fosfomicina; AMK: amicacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Para os antibióticos TGC e COL foram usadas as recomendações EUCAST (2016). *Os valores de CMI para a ciprofloxacina foram adicionalmente determinados por microdiluição para testar a presença de susceptibilidade reduzida a esta fluoroquinolona.

Tabela 21. Valores de CMI (mg/L) de antibióticos beta-lactâmicos para os isolados de *Salmonella enterica* ser. 4[5],12:i:- em estudo.

Isolado	CMI (mg/L)																	
	AMP	AMC	A/S	AZT	CTX	CTX/CA	CEF	CXM	CAZ	CAZ/CA	CPE	CFX	PI	PI/T	DOR	IMP	MER	ERT
6	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
7	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
9	> 16	16/8	> 16/8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	32	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	> 64	64	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
10	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
14	> 16	16/8	> 16/8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	16	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	> 64	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
36	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
41	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
57	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
58	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
59	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
60	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
61	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
62	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
68	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
69	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
70	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
71	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
72	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
73	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
76	> 16	≤ 8/4	16/8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	> 64	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
82	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; A/S: ampicilina-sulbactam; AZT: aztreonam; CTX: cefotaxima; CTX/CA: cefotaxima-ácido clavulânico; CEF: cefalotina; CXM: cefuroxima; CAZ: ceftazidima; CAZ/CA: ceftazidima-ácido clavulânico; CPE: cefepima; CFX: ceftoxitina; PI: piperacilina; PI/T: piperacilina-tazobactam; DOR: doripenem; IMP: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Não existem “breakpoints” definidos para os antibióticos CTX/CA, CEF e CAZ/CA.

Tabela 22. Valores de CMI (mg/L) de vários antibióticos para os isolados de *Salmonella enterica* ser. 4[5],12:i:- em estudo.

Isolate	CMI (mg/L)														
	NA	CIP*	LEV	NOR	NIT	C	SXT	TE	MIN	TGC	COL	FOS	AMK	GEN	TOB
6	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
7	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
9	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	> 16	> 4/76	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	4
10	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
14	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	> 16	> 4/76	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
36	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
41	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	4
57	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
58	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	4	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
59	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
60	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
61	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
62	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
68	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
69	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
70	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
71	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
72	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
73	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
76	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	> 16	> 4/76	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
82	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2

NA: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; NOR: norfloxacina; NIT: nitrofurantoina; C: cloranfenicol; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole; TE: tetraciclina; MIN: minociclina; TGC: tigeciclina; COL: colistina; FOS: fosfomicina; AMK: amicacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Para os antibióticos TGC e COL foram usadas as recomendações EUCAST (2016). *Os valores de CMI para a ciprofloxacina foram adicionalmente determinados por microdiluição para testar a presença de susceptibilidade reduzida a esta fluoroquinolona.

Tabela 23. Valores de CMI (mg/L) de antibióticos beta-lactâmicos para os isolados de *Salmonella enterica* não serotipáveis. em estudo.

Isolado	CMI (mg/L)																	
	AMP	AMC	A/S	AZT	CTX	CTX/CA	CEF	CXM	CAZ	CAZ/CA	CPE	CFX	PI	PI/T	DOR	IMP	MER	ERT
15	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
21	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
49	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
98	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5
101	≤ 8	≤ 8/4	≤ 8/4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5/4	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 0.25/4	≤ 1	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; A/S: ampicilina-sulbactam; AZT: aztreonam; CTX: cefotaxima; CTX/CA: cefotaxima-ácido clavulânico; CEF: cefalotina; CXM: cefuroxima; CAZ: ceftazidima; CAZ/CA: ceftazidima-ácido clavulânico; CPE: cefepima; CFX: ceftoxitina; PI: piperacilina; PI/T: piperacilina-tazobactam; DOR: doripenem; IMP: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Não existem “breakpoints” definidos para os antibióticos CTX/CA, CEF e CAZ/CA.

Tabela 24. Valores de CMI (mg/L) de vários antibióticos para os isolados de *Salmonella enterica* não serotipáveis em estudo.

Isolate	CMI (mg/L)														
	NA	CIP*	LEV	NOR	NIT	C	SXT	TE	MIN	TGC	COL	FOS	AMK	GEN	TOB
15	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
21	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
49	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
98	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2
101	≤ 16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	≤ 32	≤ 8	≤ 2/38	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 2	≤ 32	≤ 8	≤ 2	≤ 2

NA: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; NOR: norfloxacina; NIT: nitrofurantoína; C: cloranfenicol; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole; TE: tetraciclina; MIN: minociclina; TGC: tigeciclina; COL: colistina; FOS: fosfomicina; AMK: amicacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina. Os valores a negrito correspondem a um fenótipo de resistência, de acordo com as recomendações CLSI (2016). Para os antibióticos TGC e COL foram usadas as recomendações EUCAST (2016). *Os valores de CMI para a ciprofloxacina foram adicionalmente determinados por microdiluição para testar a presença de susceptibilidade reduzida a esta fluoroquinolona.

Tabela 25. Padrões de resistência aos antimicrobianos das estirpes de *Salmonella* não Typhi e a presença de genes de resistência.

ID	Padrão de resistência	Sulfamidas	Trimetoprim	Cloranfenicol	B-lactâmicos	Colistina
S9	AMP, A/S, PI, C, SXT	<i>sulI</i>	<i>dfrA1</i>	-	<i>bla_{TEM}</i>	nd
S14	AMP, A/S, PI, C, SXT	<i>sul I</i>	<i>dfrA1</i>	-	<i>bla_{TEM}</i>	nd
S43	COL	nd	nd	nd	nd	-
S45	COL	nd	nd	nd	nd	-
S53	COL	nd	nd	nd	nd	-
S53	COL	nd	nd	nd	nd	-
S67	COL	nd	nd	nd	nd	-
75	COL	nd	nd	nd	nd	-
S76	AMP, PI, C, SXT	<i>sul I</i>	<i>dfrA1</i>	-	<i>bla_{TEM}</i>	nd
S78	COL	nd	Nd	nd	nd	-
S83	AMP, A/S, PI	nd	Nd	nd	<i>bla_{TEM}</i>	nd

Legenda: C: cloranfenicol; SXT: sulfametoxazole-trimetoprim; Amp: ampicilina, A/S: ampicilina/sulbactam; Pi: piperacilina; COL: colistina; (-) gene não detectado; nd: não determinado.

4.2.2. Tipagem molecular das *S. enterica* não Typhi

A relação clonal entre os isolados de *S. enterica* não Typhi, de origem clínica, alimentar ou de águas residuais foi efectuada por *XbaI*-PFGE. Esta técnica de tipagem molecular permitiu discriminar 4 pulsotipos (A a D) entre os 55 isolados (Figura 13). O pulsotipo mais frequente, B, consistindo em 28 isolados, 20 dos quais do serovar 4[5],12:i:-, quatro do serovar Typhimurium e quatro de serovar desconhecido. A tipagem por MLST de sete isolados representativos do pulsotipo B, incluindo os de serovar desconhecido, revelou que todos pertencem ao ST313. O segundo pulsotipo mais frequente, A, é representado por 20 isolados, maioritariamente do serovar Enteritidis. A tipagem por MLST de três isolados representativos deste pulsotipo demonstrou que pertencem ao ST11. O pulsotipo C é composto por quatro isolados, três de serovar Typhimurium e um de serovar desconhecido, enquanto o pulsotipo D contém três isolados Typhimurium.

A tipagem por MLST revelou que um dos isolados do pulsotipo C pertence a um novo ST. Por sua vez, um dos isolados do pulsotipo D pertence ao ST1561. Todos os pulsotipos contém amostras de origem clínica, alimentar e ambiental, à excepção do pulsotipo D composto apenas por isolados de origem ambiental.

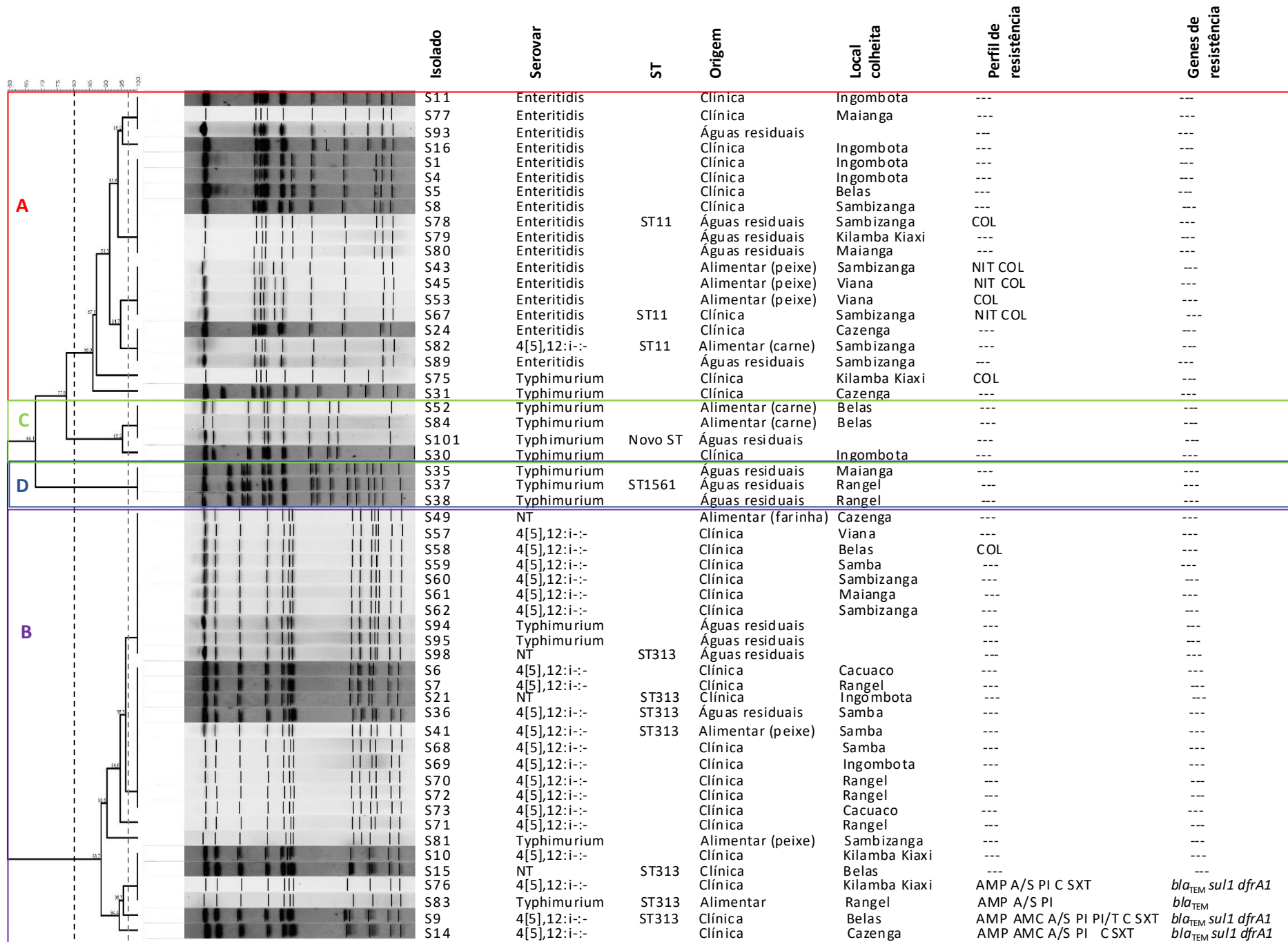


Figura 13. Relação clonal dos 55 isolados de *S. enterica* não Typhi e a correlação com os padrões de resistência antimicrobiana e os determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos. Os isolados foram considerados como pertencentes ao mesmo pulsotipo quando apresentarem valores de semelhança $\geq 80\%$ (linha preta a tracejado) e ao mesmo subtipo quando esses valores eram $\geq 97\%$ (linha cinzenta a tracejado). NT: não serotipável; ST: sequência tipo; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; A/S: ampicilina-sulbactam; PI: piperacilina; PI/T: piperacilina-tazobactam; C: cloranfenicol; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

4.2.3. Análise estatística

A análise estatística, evidenciou diferenças significativas entre os isolados de origem clínica (n=42), ambiental (n=13) e alimentar (n=10) ($p < 0.001$); enquanto os resultados não evidenciaram diferenças significativas entre os isolados provenientes de alimentos (n=10) e ambientais (n=13), sendo $p=0.556$ ($p > 0.005$). Sendo assim, podemos considerar que com base na amostragem efectuada neste estudo a infecção por *Salmonella* em Luanda, tem principalmente origem clínica, isto é, e a maioria dos casos de salmonelose em humanos detectado neste trabalho correspondem a um conjunto restrito de estirpes/serotipos/pulsotipos/ linhagens MLST que se está a transmitir entre humanos, com especial relevância para a linhagem MLST ST313 altamente invasiva, não tendo sido possível encontrar uma correlação significativa com a transmissão via alimentos e ambiente. Ver **Tabela 26**.

Tabela 26. Valores estatísticos obtidos para as correlações entre as amostras clínicas ambientais e alimentos.

Amostras	Ambientais N= 13	Alimentos N=10	Ambientais + Alimentos N=23
Clinicas N=42	P <0.001	P <0.0001	P=0.556 ($p > 0.005$)

5. Discussão e Conclusões

As infecções devidas a *Salmonella* spp. em África estão longe de estarem bem estudadas e compreendidas, em grande parte devido a recursos insuficientes destinados ao diagnóstico laboratorial e infra-estruturas insuficientes para apoiar estudos epidemiológicos e clínico-laboratoriais. *Salmonella enterica* ser. Typhi, o agente etiológico da febre tifóide, está muito adaptada ao homem com consequências graves na saúde pública, sobretudo em países menos desenvolvidos, devido às fracas condições higiénicas, de saneamento do meio ambiente e de falta de medidas e políticas para se lidar com esta enfermidade pelo que se encontra muito disseminada em África.

Acresce ainda o aumento da resistência aos antibióticos, em particular devido ao aumento exponencial da transferência de β -lactamases de largo espectro (ESBLs), sendo hoje motivo de grande preocupação em todo o mundo. Até agora, essas enzimas foram detectadas em muitas espécies da família das Enterobacteriaceae, incluindo diferentes serovares de *Salmonella enterica* e o seu grau de disseminação e capacidade de conferirem resistências de espectro mais alargado aos β -lactâmicos é cada vez maior (Pokharel, *et al.*, 2006; Garcia-Migura, *et al.*, 2014). Em África, alguns estudos caracterizaram a presença das ESBLs: TEM, SHV, CTX-M e OXA em isolados de *Salmonella* spp. a partir de amostras humanas. (Usha *et al.*, 2008; Liebana, *et al.* 2013). A diversidade de ESBLs sugere que a sua incidência em *Salmonella* spp. se torne uma emergência de saúde pública e precisa de ser monitorizada de forma contínua.

Durante este estudo foi possível caracterizar 10 isolados de *Salmonella enterica* serovar Typhi a partir de amostras clínicas de pacientes com suspeita de febre tifóide ou doença entérica. A detecção do gene *sulI* em 6 destes isolados corrobora a alta prevalência deste gene em Enterobacteriaceae, e muitos estudos relataram este gene em *S. enterica* ser. Typhi associado à resistência ao trimetoprim-sulfametoxazole (Akhtar *et al.*, 2015). Nestas estirpes não foram também detectados genes de resistência ao cloranfenicol (*cmlA* e *FloR*). Para os dois isolados de *Salmonella enterica* serovar Typhi com susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina foi possível encontrar uma substituição na região determinante para a resistência a quinolonas (QRDR) no gene *gyrA* nas posições 83 e 87, como identificado anteriormente entre os isolados de *S. enterica* serovar Typhi com diminuição da suscetibilidade à ciprofloxacina (Harish, *et al.*, 2008). Nas salmonelas, as mutações no gene *gyrA* nas posições 87 e 83 são comuns e frequentemente encontradas na QRDR.

Estudos realizados em vários países como Espanha, Coreia e Reino Unido demonstraram a dispersão deste padrão (Kongsoi, *et al.*, 2016; Kim, *et al.*, 2016; Campioni, *et al.*, 2016). Estas mutações são consequência da substituição de aminoácidos no gene *gyrA*, de serina a fenilalanina no codão 83 (S83F), e de ácido aspártico a asparagina (D87N), glicina (D87G) ou tirosina (D87Y) no codão 87, e frequentemente apresentam-se de forma dupla em ambas posições 83 e 87 (*gyrA*-S83F-D87N), estas mutações têm sido associadas aos altos níveis de resistência a fluoroquinolonas, incluindo a ciprofloxacina, em isolados de *Salmonella* spp. em várias regiões do mundo (Kongsoi *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Campioni *et al.*, 2016).

As linhagens ST1 e ST2 de *S. enterica* ser. Typhi observadas neste estudo corroboram a análise e distribuição global das linhagens de *Salmonella enterica* confirmando a predominância das linhagens ST1 e ST2 coexistentes em regiões endêmicas como a Africana (Dahiya *et al.*, 2013). Estes STs (*sequence types* – sequências tipos) foram já encontrados e descritos em estudos anteriores em África (Dahiya *et al.*, 2013). Além disso, tanto por PFGE como por MLST foi possível constatar uma alta clonalidade dos dez isolados de *S. enterica* ser. Typhi. Esses resultados sugerem a necessidade de uma contínua monitorização da resistência e das mudanças epidemiológicas entre as estirpes de *Salmonella* spp. como agente patogénico com alto impacto na saúde pública em Angola. Por sua vez, estirpes de *S. enterica* ser. Typhi pertencentes a ST8 são actualmente confinadas no continente africano (Yap, *et al.*, 2016). Algumas hipóteses apontam que a linhagem ST8 pode ter divergido das linhagens ST1 e ST2, suas ancestrais. Estas sequências tipos foram encontradas em estudos anteriores em outros países africanos, como o Senegal e a República Democrática do Congo (Dahiya, *et al.*, 2013). Nos últimos anos, novos esquemas de tipagem com recurso a *Nucleotide Polymorphisms* foram desenvolvidos para aumentar a discriminação de *S. enterica* ser. Typhi, levando à identificação de 85 haplótipos. Destes, o H58 é amplamente distribuído, com foco particular na Ásia e vários países do Leste Africano, e frequentemente associado a fenótipos de multirresistencia e / ou baixa resistência a fluoroquinolonas (Wong, *et al.*, 2015). No entanto, o nosso estudo mostrou que nenhum dos isolados de Angola pertence a este haplótipo. Este estudo é o primeiro relatório epidemiológico de *S. enterica* ser. Typhi de Angola existente na literatura internacional (Francisco *et al.*, 2018). Neste

trabalho foram demonstradas provas de ocorrência de estirpes resistentes a antibióticos de primeira linha e com susceptibilidade reduzida a fluoroquinolonas em Angola. O último resultado é particularmente preocupante, pois as fluoroquinolonas fazem parte dos regimes terapêuticos alternativos críticos nos países em desenvolvimento, como exemplificado pelos esquemas terapêuticos prescritos aos pacientes dos quais as estirpes em estudo foram isoladas. Esses resultados fornecem uma descrição preliminar da *S. enterica* ser. Typhi que circulam em Luanda, Angola e enfatizam a necessidade de monitorização contínua deste agente patogénico para detectar qualquer alteração nos padrões epidemiológicos e moleculares e fornecer informações para implementar melhores estratégias epidemiológicas para o controlo da febre tifóide.

Quanto aos restantes 55 isolados de *S. enterica* não Typhi (n=32 (58%) de origem clínica; n=13 (22.4%) de origem ambiental e n=10 (18.18%) de origem alimentar) confirmou-se ser uma das principais infecções de transmissão clínica, ambiental e alimentar para a saúde pública em Angola. O interesse por estas salmonelas está relacionado com a complexa epidemiologia, patogenicidade, capacidade invasiva, serovares resistentes a vários antimicrobianos, genes de virulência e a escassez de dados sobre a prevalência dos diferentes sorovares, sua morbilidade assim como o real significado de genes de resistência transmissíveis à cadeia alimentar do homem. Assim, cada país ou região geográfica precisa implementar uma vigilância epidemiológica proativa dos serovares de *Salmonella* spp., tendo sempre em conta as características e especificidades de cada país quer das condições higiénico-sanitárias do meio, como com a componente social.

Angola, sendo um país importador de alimentos como carne bovina, suína e frangos, *etc.* não possui ainda políticas bem direccionadas, assim como uma estrutura organizada com capacidade de intervenção quer do ponto de vista de saúde pública como da vigilância alimentar e do comércio, não considerando o impacto económico que esta infecção está a produzir no país. Esta debilidade traduz-se na escassez de dados de vigilância epidemiológica das salmonelas aos diferentes níveis e instituições assim como a falta de acompanhamento da evolução do número de casos e morbilidade dos diferentes serovares de salmonelas. Tal como aconteceu no nosso trabalho, muitos estudos têm apontado a presença de estirpes de *Salmonella* spp. em vários alimentos como vegetais, peixe, frutos do mar, frango, *etc.* com implicações graves para a saúde pública e com perfil de

resistência similar das isoladas em humanos (Amanchaipattana *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Elhadi, 2014), sendo a falta de boas práticas higiénicas na cadeia de conservação, transporte, processamento e comercialização de alimentos associada como factor preponderante para a contaminação de alimentos por *Salmonella* spp.

A presença neste estudo de 38% de *S. enterica* ser. Typhimurium variante monofásica 4,[5],12:i:-, doraavante denominada *S. enterica* ser. 4,[5],12:i:- prevalente na Europa, demonstra a alta mobilidade dos diferentes serovares de *Salmonella* spp.. Este facto, está associado à comercialização de produtos alimentares à escala mundial, abrindo caminho para a mobilidade de agentes infecciosos como as salmonelas. A prevalência de *S. enterica* ser. 4,[5],12:i:- tem estado a aumentar entre as salmoneloses em todo o mundo desde meados dos anos 1990 (Echeita, *et al.*, 1999; Switt, *et al.*, 2009). Estudos realizados no Japão em estirpes de *S. enterica* ser. 4,[5],12:i:- isoladas em suínos e humanos, apresentavam perfis idênticos ou estreitamente relacionados ao serem analisados por PFGE e MLVA, sugerindo deste modo que os suínos poderiam ser a fonte de infecção deste serovar para humanos. Embora as amostras que deram origem a esses isolados fossem colhidas de cidades diferentes e sem contacto directo entre os homens e animais, estes resultados demonstraram a possibilidade de a carne do porco ser um reservatório de *S. enterica* ser. 4,[5],12:i:- (Hauser, *et al.*, 2010; Mossong, *et al.*, 2007). Por outro lado, a presença de tipos idênticos, bem como os perfis de PFGE e MLVA em isolados de *S. enterica* ser. 4,[5],12:i:- em humanos e animais, sugerem a existência de ligações entre infecções em humanos e reservatórios de animais (Hauser *et al.*, 2010; Mossong *et al.*, 2007). O impacto da infecção de *S. enterica* ser. 4,[5],12:i:- para a saúde pública é maior ainda devido às altas taxas de resistências associadas a este serovar. Em particular, é de salientar que não foi encontrada neste estudo a linhagem clonal e epidémica de *S. enterica* ser. a 4,[5],12:i:- multiresistente; designado como clone Europeu com resistência a ampicilina, eritromicina, sulfamidas e tetraciclina (R-type ASSuT) (Hopkins *et al.*, 2010), emergiu na Europa e tem estado implicado em vários surtos (Barco *et al.*, 2014); Mossong *et al.*, 2006). Algumas estirpes de *S. enterica* ser. 4,[5],12:i:- isoladas em Espanha, América e Canadá apresentam resistência adicional a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (R-type ACSSuT) (Echeita *et al.*, 2001; Mulvey *et al.*, 2013). A emergência da expansão de *S. enterica* ser. 4,[5],12:i:- deve

merecer toda a atenção, pois este tem estado associado a surtos por consumo de alimentos contaminados tal como aconteceu no Luxemburgo em 2006 (Amavisit *et al*, 2005) e na Itália em 2010 (Barco *et al*, 2014) e que pode ser associado a doença severa e mesmo a morte.

Em conclusão, neste primeiro estudo realizado em Angola sobre esta temática, determinou-se a presença dos serovares Enteritidis, Typhimurium e sua variante monofásica 4,[5],12:i:- em amostras clínicas, ambientais e alimentares, tendo a maior parte dos isolados apresentado susceptibilidade a todos os antibióticos testados. No entanto, este facto sublinha a possíveis e mais prováveis vias de transmissão da doença – na nossa amostra a transmissão de humano a humano - mas também evidencia a morbidade destes serovares quando encontram condições propícias para a colonização humana e do meio ambiente com deficientes condições de saneamento básico e consequentemente a sua propagação e disseminação na população. Estes resultados, por outro lado, vêm demonstrar que em função das condições e modo de vida de uma determinada comunidade, assim como do ambiente que a rodeia, a transmissão da salmonelose para o homem pode ocorrer de diferentes formas, mas a mais importante continua a ser a transmissão humano a humano onde as boas condições de saneamento básico desempenham papel fundamental. No caso concreto de África, e Angola em particular, tudo parece indicar que a transmissão destas doenças para o homem ocorre de várias formas, quer através dos alimentos contaminados ou transmissão a partir do meio ambiente, mas ocorre sobretudo por contacto de pessoa a pessoa. As condições de saneamento básico que enfrenta hoje a cidade de Luanda, associado com o crescimento desordenado da cidade e em muitos casos sem condições de habitabilidade assim como a falta de educação sanitária junto das comunidades, são aspectos cruciais para a morbidade de qualquer doença infecciosa e em particular as salmoneloses. Por não existirem estudos prévios sobre a incidência das salmonelas em Angola, torna-se difícil estabelecer uma comparação destes resultados; no entanto, estes dados podem ser comparados com outros estudos feitos noutros países com condições similares às da cidade de Luanda.

Numerosos surtos devido a contaminação alimentar por *S. enterica* não Typhi têm sido estudados nos países industrializados e descritos também em vários países africanos. Em

África, estirpes de *S. enterica* não Typhi têm sido isoladas também em gado bovino, cabras, porcos, entre outros animais de produção. A identificação de pontos críticos no abate de animais, processamento e conservação da carne, assim como a sua comercialização têm sido alvo de preocupações acrescidas, quer nos países desenvolvidos como nos sub-desenvolvidos, para a contenção das infecções por *Salmonella* spp. (Schlundt *et al.*, 2004). No caso de África, as preocupações ainda são mais acrescidas uma vez que se assiste ao rápido aumento do número de casos de salmonelose invasiva não tifóide associado aos imensos factores de risco que propiciam a morbilidade da doença. A falta de água potável em muitas comunidades, a má nutrição, o VIH, a malária, o contacto directo e indirecto com animais, as infecções intrahospitalares, a transmissão entre os humanos e outras doenças endémicas proporcionam um ambiente favorável para altas prevalências desta infecção altamente transmissível. A contaminação dos alimentos vendidos na rua tem aqui um papel importante na cadeia epidemiológica das doenças de fórum gastroentérico, colocando os consumidores destes alimentos em potencial risco de contrair doença através destes alimentos (INFOSAN, 2010).

No nosso estudo, a presença de salmonelas em alimentos de consumo humano como peixe, farinha de milho e frango que são também comercializados na rua e em locais com condições higiénicas desadequadas reforça a ideia de ocorrência de contaminação cruzada entre os vários intervenientes na cadeia epidemiológica da salmonelose. Este facto exige das autoridades sanitárias e da comunidade científica uma busca constante de informações epidemiológicas sobre a salmonelose através de pesquisa direccionada para as vertentes clínica, epidemiológica e laboratorial.

A análise por *XbaI*-PFGE permitiu discriminar os isolados de *S. enterica* não Typhi em quatro pulsotipos. O pulsotipo mais frequente, B (n = 28), engloba a maioria das estirpes pertencentes ao serovar 4,[5],12:i:- (n = 20), quatro estirpes de serovar Typhimurium e quatro estirpes de serovar desconhecido; sendo maioritariamente de origem clínica (n = 20). A tipagem por MLST de estirpes representativas (n = 7) dos vários serovares e da origem de amostra, revelou que todas pertencem à linhagem clonal ST313. A linhagem ST313 está associada a estirpes de *S. enterica* ser. Typhimurium e suas variantes, responsáveis por graves infecções invasivas na África subsaariana (Kingsley *et al.*, 2009).

Em particular, a presença do clone ST313 tem sido descrita em países como Moçambique (Mandomando *et al.*, 2015) Nigéria e República Democrática do Congo (Leekitcharoenphon *et al.*, 2013) Quênia (Akullian *et al.*, 2018) e Burkina Faso (Kagambèga *et al.*, 2018). Recentemente, esta linhagem clonal foi também descrita como causa de infecções invasivas no Brasil (Almeida *et al.*, 2017) e Reino Unido (Ashton *et al.*, 2017). O segundo pulsotipo mais frequente (n= 20), A, engloba os isolados de serovar Enteritidis. A tipagem por MLST de três estirpes representativas deste pulsotipo, incluindo uma estirpe de serovar 4,[5],12:i:-, mostrou que estas estirpes pertencem à linhagem clonal ST11. Este clone, associado ao serovar Enteritidis, encontra-se disseminado globalmente, tendo sido reportado no continente africano, como Moçambique (Mandomando *et al.*, 2015), Tunísia (Ktari *et al.*, 2016) e Quênia (Akullian *et al.*, 2018), na Europa (Papadopoulos *et al.*, 2016; Antunes P *et al.*, 2011), na Ásia (Kim *et al.*, 2011; Ghaderi *et al.*, 2015; Zhao X *et al.*, 2016) e também no continente americano (Bado *et al.*, 2012). Por sua vez, o pulsotipo D, caracterizado por estirpes de serovar Typhimurium isoladas de águas residuais, está associado ao ST1561. A ocorrência de estirpes desta linhagem é pouco frequente. A maioria das estirpes, reportadas no continente asiático e americano, tem origem animal, ambiental ou alimentar, mas encontram-se relacionadas com o serovar Idikan. Até à data, apenas uma estirpe de origem humana foi reportada no Vietname (Patchanee *et al.*, 2015). Do pulsotipo C, associado a estirpes Typhimurium de origem diversa, foi seleccionada para tipagem por MLST a estirpe de serovar desconhecido. Esta estirpe apresenta um novo ST, com perfil alélico 10-71-43-12-15-20-18. Este ST é um SLV de ST212 (variação em *hemD*), ST808 (variação em *purE*) e ST3126 (variação em *hemD*), linhagens associadas ao serovar Kottbus e a estirpes de diversas origens.

A informação acerca das diferentes linhagens de *S. enterica* spp. que circulam no país, determinada e caracterizada neste estudo, vai contribuir para comparar a evolução epidemiológica das estirpes de *Salmonella* spp. sobretudo na salmonelose humana através da investigação epidemiológica molecular de *Salmonella* spp. em Angola, documentando desta forma melhor a informação sobre a Salmonelose *sensu lato* no país.

A resistência aos antimicrobianos, varia de acordo com a área geográfica assim como no ambiente onde as estirpes são isoladas. A resistência aos antimicrobianos é um fenómeno

que está a aumentar de forma rápida em todo mundo; o uso indiscriminado e abuso dos antimicrobianos tem facilitado a emergência de resistência em muitos serovares de salmonelas (Tondo & Ritter, 2012). No entanto, a resistência aos antimicrobianos em *S. enterica* ser. Enteritidis tem sido considerada baixa em relação ao aumento dramático de resistência nos isolados de *S. enterica* ser. Typhimurium (Yang *et al.*, 2002). Uma atenção deve ser observada sobretudo quando se isola frequentemente *S. enterica* ser. Enteritidis resistente a um ou mais antimicrobianos. O incremento das ações de vigilância de resistência antimicrobiana, em especial para o serovar Enteritidis, é de especial importância por ser o serovar frequentemente isolado da salmonelose humana nos últimos anos em muitos países. No nosso estudo a presença de enteritidis é significativa representando (30.9 %) de todos os isolados e deve merecer uma atenção especial e acrescida do ponto de vista da monitorização das resistências aos antimicrobianos. Muitos estudos têm reportado resistência de diferentes serovares de salmonelas ao cloranfenicol, ampicilina, trimethoprim/sulfametaxazole, *etc.* (De Oliveira *et al.*, 2006, Geimba *et al.*, 2005). Em vários estudos têm-se encontrado diferenças do perfil de resistência dos diferentes serovares de salmonelas; Geimba *et al.* (Geimba *et al.*, 2005) ao analisarem isolados de *S. enterica* ser. Enteritidis envolvidos em surtos de intoxicação alimentar entre 1999 e 2000, no Rio Grande do Sul, Brasil, encontraram que 95.9% de isolados de *Salmonella enterica* eram sensíveis a trimethoprim/sulfametaxazole e 98.6% ao cloranfenicol. O estudo realizado na Dinamarca entre 1995 a 2005 onde foram examinados 2.546 isolados de *S. enterica* ser. Enteritidis demonstrou que 82 isolados (3.2%) eram resistentes ao ácido nalidíxico (Molbak *et al.*, 2002). Num outro estudo anterior a este, (Breuil *et al.*, 2000) encontraram percentagens baixas de resistência a ácido nalidíxico (2% a 4 %) em *S. enterica* ser. Enteritidis isoladas em amostras de humanos e animais em França entre 1994 e 1997. Geimba *et al.*, 2005 observaram que em 1999, 12.8% de isolados de *S. enterica* ser. Enteritidis envolvidos em surtos no Rio Grande do Sul, Brasil, eram resistentes ao ácido nalidíxico; em 2000 esta percentagem subiu para 14.7%.

Estas diferenças no perfil de resistência aos antimicrobianos tem a ver, em parte, com o uso indiscriminado dos antibióticos no processo de criação animal e a atitude do homem face ao uso dos antibióticos, o que providencia terreno para a propagação de resistências e consequentemente o surgimento de novas mutações e fenómenos de resistência,

aumentando assim a pressão nos serviços médicos na escolha do melhor regime terapêutico para o tratamento das salmoneloses e para o controle médico destas infecções.

O desenvolvimento da resistência antimicrobiana entre isolados de *Salmonella* não Typhi tem sido observado com uma prevalência crescente nas últimas décadas. Uma tendência importante tem sido o desenvolvimento de resistência entre isolados de *Salmonella* Typhimurium, mas também em outros serovares. O fenótipo de multirresistência em *S. enterica* ser. Typhimurium apareceu no início do 1980, no Reino Unido, onde estava intimamente associado a um tipo de fago específico designado DT104 (Threlfall, 2000). Esses isolados apresentaram resistência a cinco agentes antimicrobianos - ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina - um fenótipo de resistência geralmente referido como ACSSuT de tipo R. Na década de 1990, este fenótipo tinha sido relatado em vários outros países da Europa, bem como nos Estados Unidos, Canadá, Israel, Turquia e Japão (Parry, 2003; CDC, 2010).

Outro perfil de resistência importante entre os isolados de *salmonella* não Typhi tem sido o desenvolvimento de resistência a quinolonas (ácido nalidíxico) e fluorquinolonas tais como ciprofloxacina. Embora o ácido nalidíxico não seja usado para o tratamento, o desenvolvimento de resistência a este medicamento é de grande importância clínica, uma vez que está associado à redução da eficácia clínica dos tratamentos com fluorquinolona (Dimitrov *et al.*, 2007; Stevenson *et al.*, 2007). Mesmo após a introdução de fluoroquinolonas começaram a surgir relatos de resistência a quinolonas entre os isolados de *Salmonella* não typhi. Na Dinamarca, a resistência à quinolona em *Salmonella* serovar Enteritidis aumentou de 0,8% em 1995 a 8,5% em 2000. Em 2000, um grande estudo de vigilância europeia, que incluiu 27 mil isolados, relatou resistência às fluorquinolona de baixo nível em 13% em *S. enterica* ser. Typhimurium, 8% em *S. enterica* ser. Enteritidis, 53% em *S. enterica* ser. Virchow, e em 57% de isolados de *S. enterica* ser. Hadar (Threlfall *et al.*, 2003). No Sudeste Asiático, vários estudos documentaram o surgimento de isolados de *Salmonella* resistentes a quinolonas e a fluorquinolonas. Em 2009, uma alta prevalência de susceptibilidade a ciprofloxacina foi relatada entre as estirpes de *Salmonella* nas Filipinas (15%), Singapura (25%) e Tailândia (46,2%) (Lee *et al.*, 2009). O desenvolvimento de resistência nos isolados de *Salmonella* spp. a β -lactâmicos de espectro alargado, representa outra preocupação substancial em saúde pública. Estes

antibióticos são importantes para o tratamento de infecções invasivas de *Salmonella* spp., e o surgimento de cada vez mais resistências coloca pressão no sistema de saúde mundial na escolha terapêutica tornando as situações clínicas muito complicadas de gerir.

Em conclusão, foi possível ao longo destes cinco anos de trabalho colher, processar, isolar, identificar e caracterizar os diferentes serovares de *Salmonella* spp. isoladas de amostras clínicas, águas e alimentos em Luanda, determinando-se os padrões fenotípicos e genotípicos de resistência aos antibióticos, avaliando-se epidemiologicamente a clonalidade dos isolados e comparando-os com as bases de dados epidemiológicas mundiais. A relação epidemiológica encontrada entre estirpes de origem clínica, alimentar e ambiental foi determinada, tendo sido possível efectuar a primeira caracterização da situação epidemiológica real das infecções por *Salmonella* spp. em Luanda, Angola.

É importante realçar as dificuldades e limitações encontradas no decorrer deste trabalho. Como podemos observar, a nossa amostra não foi muito grande, devido por um lado a falta de apoio logístico e financeiro, assim como houve falta de sensibilidade das instituições interessadas no controlo da febre tifóide e outras salmoneloses em Angola, principalmente os ministérios da Saúde e da Agricultura e Comércio. Os fatores acima referenciados, associados às dificuldades em conciliar a atividade discente em Portugal e a atividade de campo em Angola condicionou em grande medida a colheita de mais amostras e consequentemente mais isolados de *Salmonella* spp. No nosso entender, perspetivando o futuro e tendo em conta a experiência obtida neste trabalho, será importante, durante o desenho de qualquer estudo similar, estabelecer parcerias com instituições de investigação, sobretudo académicas, de forma a vincular a investigação com a formação, sobretudo ao nível de mestrados como doutoramentos, de forma a rentabilizar os gastos em recursos materiais, financeiros e humanos. Com este trabalho, abre-se uma área de pesquisa que muita falta para o país, Angola. É do interesse de Angola continuar esta investigação sobre a epidemiologia e caracterização biológica de *Salmonella* Typhi e as não Typhi invasivas, nos mais variados aspetos, epidemiológicos, prevalência, patogenicidade, resistência aos antibióticos, entre outros.

5.1. Considerações finais e desafios para o futuro do controlo das Salmoneloses em Angola

A fragilidade do SNS de Angola e da Autoridade para a Segurança Alimentar de Angola, associada à incerteza do real impacto da infeção por salmonelas em Angola, por ausência de informação, exige a execução de estudos epidemiológicos-laboratoriais e clínicos, como o desenvolvido nesta tese, cujos resultados reforçam a importância da criação e manutenção de programas de vigilância epidemiológica para monitorizar a ocorrência, frequência, tipo, mobilidade e morbilidade dos diferentes serovares, assim como identificar os padrões de resistência aos antimicrobianos nas estirpes de *Salmonella* spp. circulantes em Angola. Para se atingir este propósito será necessário investir em recursos humanos e infraestruturas qualificadas, sobretudo de diagnóstico laboratorial, que sejam capazes de apoiar não só as emergências epidemiológicas mas também os serviços clínicos assistenciais e a saúde pública angolana.

Na perspectiva da saúde pública, uma importante mudança da conduta das pessoas nas comunidades deve ser promovida, passando necessariamente por uma maior educação sanitária e ambiental da população direccionada para a prevenção destas doenças e sua transmissão. A venda e comercialização de alimentos com segurança sanitária, quer no mercado formal quer no informal, é um facto importante e que deve merecer a atenção das autoridades do comércio, inspeção sanitária, polícia económica e outros operadores que, de uma ou outra forma, regulam a comercialização dos produtos alimentícios no seio das comunidades. A cidade de Luanda, com 24 milhões de habitantes e com um mercado informal muito forte de venda de alimentos em condições não adequadas, deve exigir das autoridades medidas políticas de contenção e vigilância sanitária desta actividade e estabelecer normas que visam regular a venda de alimentos na rua para garantir a saúde das pessoas e um ambiente saudável para a saúde pública.

O abuso e o mau uso da utilização de antibióticos, tanto na medicina humana quanto na veterinária, contribuem para a selecção de microorganismos resistentes e promovem a dispersão desta característica de forma vertical ou horizontal entre as populações. Este é

um desafio de todos; as campanhas de educação sobre o uso inadequado dos antimicrobianos quer na vertente clínica quer na vertente da educação das populações, prevenindo a automedicação e o uso de antibióticos na dieta da criação e produção de animais, devem fazer parte do programa conjunto de actividades das estruturas competentes com a ilustração dos prejuízos e benefícios dos antibióticos.

Depois de analisados os dados, resultados e conclusões obtidas nesta tese de doutoramento estamos agora em condições de sumariar e propor os desafios no contexto de Saúde Pública de Angola relativa às doenças transmitidas pela água e alimentos em particular *Salmonella* Typhi e outras salmoneloses. Entre os vários desafios que emergem deste trabalho e que foram sendo abordados ao longo desta tese, podemos agora propor os mais significativos e urgentes, que urge implementar no futuro próximo:

- Angola sendo um país endémico de febre tifóide e paratifóide e de salmoneloses em *sensu lato*, tem necessidade urgente de conceber estratégias e programas que visem o controlo eficaz destas infecções em todo país, mediante a implementação de acções de saúde pública na componente de vigilância epidemiológica sanitária, médica, laboratorial e alimentar, nas pequenas e grandes comunidades.
- Nos países desenvolvidos as salmoneloses são doenças transmitidas fundamentalmente através de alimentos, enquanto que nos países em vias de desenvolvimento há ainda uma enorme componente de transmissão de humano a humano por contato com fezes e águas residuais contaminadas devido à ausência de condições de saneamento básico adequadas. Em Angola, é fundamental, implementar a nível nacional, sistemas de vigilância epidemiológica para a monitorização da ocorrência e morbilidade dos diferentes serovares e a resistência destes aos antibióticos das *Salmonellas* spp., em estreita colaboração com os programas internacionais, de modo a ser possível implementar as medidas de prevenção e controlo adequadas para evitar a disseminação de serovares mais virulentos, invasivos e resistentes pelas várias vias de transmissão/contaminação possíveis.
- Melhorar a notificação de casos clínicos e a rede de vigilância laboratorial das salmoneloses *sensu lato* para diagnosticar o agente etiológico em cenários de

pequenos e grandes surtos e assim permitir a caracterização das diferentes fontes de infecção.

- Investir em infraestruturas de apoio laboratorial a nível nacional capazes de apoiar toda a actividade de vigilância das Salmoneloses *sensu lato* do ponto de vista epidemiológico, clínico e laboratorial.
- Investir na formação de recursos humanos em engenharia ambiental para elaboração de sistemas urbanos de abastecimento de água, tratamento de esgotos e resíduos sólidos, assim como operar em redes de monitorização de água e solo, *etc.*, colaborando com empresas públicas ou privadas de saneamento ambiental e gestão do meio ambiente e da saúde.
- Criar serviços de laboratórios para controlo da qualidade ambiental e de estudos de impacto ambiental, sobretudo na indústria e comércio, bem como investir na estrutura de saneamento básico das cidades.
- Criação e aprovação de regulamentos e instrumentos legais para escudar as actividades relacionadas com o controlo das doenças de impacto na saúde pública dos diferentes sectores como a saúde, agricultura, comércio e indústria.

6. Referências bibliográficas

- Aanensen, D. M., & Spratt, B. G. (2005). The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*, 33, 728-733.
- Akhtar, S., Sarker, M. R., Jabeen, K., Sattar, A., Qamar, A., & Fasih, N. (2015) Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar typhi and paratyphi in South Asia – current status, issues and prospects. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(4), 536-545.
- Akullian, A., Montgomery, J. M., John-Stewart, G., Miller, S. I., Hayden, H. S., Radey, M. C., Hager, K. R., Verani, J. R., Ochieng, J. B., Juma, J., Katieno, J., Fields, B., Bigogo, G., Audi, A., & Walson, J. (2018) Multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* associated with invasive disease in western Kenya. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1):e0006156.
- Alekshun, M. N. & Levy, S. B. (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128, 1037-1050.
- Allende, A., McEvoy, J. L., Luo, Y., Artes, F., & Wang, C. Y. (2006) Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed “Red Oak Leaf” lettuce. *Food Microbiology*, 23(3), 241-249.
- Almeida, F., Seribelli, A. A., da Silva, P., Medeiros, M. I. C., Dos Prazeres Rodrigues, D., Moreira, C. G., Allard, M. W., & Falcão, J. P. (2017) Multilocus sequence typing of *Salmonella* Typhimurium reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. *Infection Genetics and Evolution*, 5, 141-44.
- Amavisit, P., Boonyawiwat, W., & Bangtrakulnont, A. (2005) Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- isolates in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2736-2740.
- Andrews, W. H., Wang, H., Jacobson, A., & Hammack, T. (2014) Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: *Salmonella* In: Food and Drug Administration. Silver Spring: FDA. Disponível em: <[http:// www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html](http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html)>. Acesso em: Setembro de 2015.
- Angulo, F. J., Johnson, K. R., Tauxe, R. V., & Cohen, M. L. (2000) Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microbial Drug Resistance*, 6, 77-83.
- Anjum, M. F., Choudhary, S., Morrison, V., Snow, L. C., Mafura, M., Slickers, P., Ehricht, R., & Woodward, M. J. (2011) Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance with *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 550-559.
- Antunes, P., Mourão, J., Machado, J., & Peixe, L. (2011) First description of *qnrS1*-IncN plasmid in a ST11 *Salmonella* Enteritidis clinical isolate from Portugal. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 69(4), 463-465.
- Arcangioli, M. A., Leroy-Setrin, S., Martel, J. L., & Chaslus-Dancla, E. (1999) A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella* typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters*, 174, 327-32.

- Arlet, G., Barrett, T. J., Butaye, P., Cloeckeaert, A., Mulvey, M. R., & White, D. G. (2006) *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes and Infection*, 8, 1945-1954.
- Ashton, P. M., Owen, S. V., Kaindama, L., Rowe, W. P. M., Lane, C. R., Larkin, L., Nair, S., Jenkins, C., de Pinna, E. M., Feasey, N. A., Hinton, J. C. D., & Dallman, T. J. (2017) Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella* Typhimurium epidemic in Africa. *Genome Medicine*, 9(1), 92.
- Amanchaipattana, C., Hostani, Y., Kawasaki, S., Pongsawat, S., Latiful, B. M., Isobe, S., & Inatsu, Y. (2012) Prevalence of foodborne pathogens in retailed foods in Thailand. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(9), 835-840.
- Al-Gallas, N., Abbassi, M. S., Gharbi, B., Manai, M., Ben Fayala, M. N., Bichihi, R., Al-Gallas, A., & Ben Aissa, R. (2013) Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and *rmtB* gene in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and Typhimurium isolated from food-animal products in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(9), 813-819.
- Ajiboye, R.M., Solberg, O. D., Lee, B. M., Raphael, E., Debroy, C., & Riley, L.W. (2009) Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 365-371.
- Anderson, E. S., Ward, L. R., Saxe, M. J., & De Sá, J. D. H. (1977) Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Hygiene (Lond.)*, 79, 297-300.
- Bado, I., García-Fulgueiras, V., Cordeiro, N. F., Betancor, L., Caiata, L., Seija, V., Robino, L., Algorta, G., Chabalgoity, J. A., Ayala, J. A., Gutkind, G. O., & Vignoli, R. (2012) First human isolate of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harboring *bla*_{CTX-M-14} in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2132-2134.
- Barco, L., Ramon, E., Cortini, E., Longo, A., Dalla Pozza, M. C., Lettini, A. A., Dionisi, A. M., Olsen, J. E., & Ricci, A. (2014) Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- DT193 ASSuT strains from two outbreaks in Italy. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11, 138-144.
- Basti, A. A., Misaghi, A., Salehi, T. Z., & Kamkar, A. (2006) Bacterial pathogens in fresh smoked and salted Iranian fish. *Food Control*, 17(3), 183-188.
- Baucheron, S., Tyler, S., Boyd, D., Mulvey, M. R., Chaslus-Dancla, E., & Cloeckeaert, A. (2004) AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48, 3729-3735.
- Bauman, R. W. (2009) Microbial Genetics. In: Microbiology. 2^a ed. Pearson: São Francisco, EUA. 7, 197-328.
- Behravesh, C. B., Ferraro, A., Deasy, M. 3rd; Dato, V., Moll, M., Sandt, C., Rea, N. K., Rickert, R., Marriott, C., Warren, K., Urdaneta, V., Salehi, E., Villamil, E., Ayers, T., Hoekstra, R. M., Austin, J. L., Ostroff, S. & Williams, I. T., and the *Salmonella*

- Schwarzengrund Outbreak Investigation Team. (2010) Human *Salmonella* infections linked to contaminated dry dog and cat food, 2006-2008. *Pediatrics*, 128(3), 477-483.
- Beloeil, P. A., Chauvin, C., Proux, K., Madec, F., Fravalo, P. & Alioum, A. (2004) Impact of *Salmonella* status of market – age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter. *Veterinary Research*, 35 (5), 513-530.
- Besser, J. M. (2018) *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology*, 71, 55-59.
- Bhan, M. K., Bahl, R., & Bhatnagar, S. (2005) Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet*. 366(9487), 749-62.
- Bischoff, K. M., White, D. G., Hume, M. E., Poole, T. L., & Nisbet, D. J. (2005) The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 243, 285-291.
- Boyd, E. F., & Hartl, D. L. (1997) Recent horizontal transmission of plasmids between natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 179 (5), 1622-1627.
- Boyd, D., Cloeckert, A., Chaslus-Dancla, E., & Mulvey, M. R. (2002) Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46, 1714-1722.
- Boxrud, D., Monson, T., Stiles, T., & Besser, J. (2010) The role of challenges, and support of PulseNet laboratories in detecting foodborne disease outbreaks. *Public Health Reports*, 125(2), 57-62.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., van Immerseel, F., Ducatelle, R., & Pasmans, F. (2008) Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology*, 130, 1-19.
- Breuil, J., Brisabois, A., Casin, I., Armand-Lefèvre, L., Frémy, S., & Collatz, E. (2000) Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 965-971.
- Briggs, C. E., & Fratamico, P. M. (1999) Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 43, 846-849.
- Brunelle, B. W., Bearson, B. L., Bearson, S. M. D., & Casey, T. A. (2017) Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates are resistant to antibiotics that influence their swimming and swarming motility. *mSphere*, 2, e00306-17.
- Bülte, M., & Jakob, P. (1995) The use of a PCR-generated *invA* probe for the detection of *Salmonella* spp. in artificially and naturally contaminated foods. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 335-344.

- Cattoir V, Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2009) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 394–397.
- Campioni, F., Souza, R. A., Martins, V. V., Stehling, E. G., Bergamini, A. M., & Falcão, J. P. (2017) Prevalence of *gyrA* mutations in nalidixic acid-resistant strains of *Salmonella* Enteritidis isolated from humans, food, chickens, and the farm environment in Brazil. *Microbial Drug. Resistance*, 23, 421–428.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 26th edition, M100-S26.
- Carattoli, A. (2003) Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Current Issues in Molecular Biology*, 5, 113-122.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219-28.
- Carattoli, A. (2009) Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (6), 2227-2238.
- Carriço, J. A., Pinto, F. R., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N. G., Frazão, N., Lencastre, H., de & Almeida, J. S. (2005) Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (11), 5483-5490.
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., & Aarestrup, F. M. (2009) *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53 (2), 603-608.
- Chau, T. T, Campbell, J. I., Galindo, C. M., Hoang, N. V. M., Diep, T. S., & Nga, T. T. (2007) Antimicrobial drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhi in Asia and molecular mechanism of reduced susceptibility to the fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 4315-4323.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013) An Atlas of *Salmonella* in the United States, 1968-2011: Laboratory-based Enteric Disease Surveillance. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2005) *Salmonella* surveillance: Annual summary. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) Multistate outbreak of human *Salmonella* Typhimurium infections associated with pet turtle exposure – United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59 (7), 191-196.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) /WHO: (2010) Laboratory Protocol for Biochemical Identification of *Salmonella* and *Shigella* using an Abbreviated Panel of Test.

- Ceyssens, P. J., Mattheus, W., Vanhoof, R., & Bertrand, S. (2015) Trends in serotype distribution and antimicrobial susceptibility in *Salmonella enterica* isolates from humans in Belgium, 2009 to 2013. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 59(1), 544-52.
- Cheung, T. K., Chu, Y. W., Chu, M. Y., Ma, C. H., Yung, R. W., & Kam, K. M. (2005) Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 586-590.
- CloECKaert, A., Praud, K., Doublet, B., Bertini, A., Carattoli, A., Butaye, P., Imberechts, H., Bertrand, S., Collard, J. M., Arlet, G., & Weill, F. X. (2007) Dissemination of an extended-spectrum- β -lactamase *bla*_{TEM-52} gene-carrying IncII plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France, 2001-2005. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 51, 1872-1875.
- Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007) *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112-118.
- Connor, B. A., & Schwartz, E. (2005) Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(10), 623-628.
- Crump, J. A., Griffin, P. M., Angulo, F. J. (2002) Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clinical Infection Diseases*, 35, 859-865.
- Crump, J. A., Luby, S. P., Mintz, E. D. (2004) The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5), 346-353.
- Crump, J. A., Heyderman, R. S. (2015) A Perspective on Invasive *Salmonella* Disease in Africa. *Clinical Infection Diseases*, 61(Suppl 4): S235–S240.
- D'Aoust, J. Y. (1994) *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology*, 24(4),11-31.
- Daly, M., Villa, L., Pezzella, C., Fanning, S., & Carattoli, A. (2005) Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 558-561.
- Dahiya, S., Kapil, A., Kumar, R., Das, B. K., Sood, S., Chaudhry, R., Kabra, S. K., & Lodha, R. K. (2013) Multiple locus sequence typing of *Salmonella* Typhi, isolated in North India- a preliminary study. *Indian Journal of Medical Research*, 137, 957-962.
- de Oliveira, F. A., Brandelli, A., & Tondo, E. C. (2006) Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *The New Microbiologica*, 29, 49-54.
- DFWED (Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases) - CDC. 2017. <https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/>
- Di Conza, J., Ayala, J. A., Power, P., Mollerach, M., & Gutkind, G. (2002) Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46, 2257-2261.

- Dimitrov, T., Udo, E. E., Albaksami, O., Kilani, A. A., Shehab, el-D. M. (2007) Ciprofloxacin treatment failure in a case of typhoid fever caused by *Salmonella enterica* serotype ParatyphiA with reduced susceptibility to ciprofloxacin. *Journal of Medical Microbiology*, 156, 277-279.
- Doublet, B., Carattoli, A., Whichard, J. M., White, D. G., Baucheron, S., Chaslus-Dancla, E., & Cloeckaert, A. (2004) Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the *floR* and *bla_{CMY-2}* genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. *FEMS Microbiology Letters*, 233, 301-305.
- Echeita, M. A., Aladueña, A., Cruchaga, S., & Usera, M. A. (1999) Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (10), 3425.
- Echeita, M. A., Herrera, S., & Usera, M. A. (2001) Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* strain 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (8), 2981-2983.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., & Sratchounski, L. (2003) Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (12), 3724-3732.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2010) Scientific opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal*, 8 (10): 1826.
- European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2017) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12), 5077.
- Eurosurveillance Editorial Team Collective. (2006) Large variation in prevalence of *Salmonella* in laying hen flocks in EU: EFSA preliminary report. *Euro Surveillance*, 11(6), E060615.4.
- Elhadi, N. (2014) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in raw retail frozen imported freshwater fish to Eastern province of Saudi Arabia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(3), 234-238.
- Enne, V. I., Bennett, P. M., Livermore, D. M., & Hall, L. M. (2004) Enhancement of host fitness by the *sul2* coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 958-963.
- Enne, V. I., Livermore, D. M., Stephens, P., & Hall, L. M. (2001) Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*, 357, 1325-1328.
- Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., Gordon, M. A. (2012) Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in África. *Lancet*; 379:2489–99.

- Feasey, N. A., Cain, A. K., Msefula, C. L., Kingsley, R. A. (2014) Drug resistance in *Salmonella enterica* ser Typhimurium bloodstream infection, Malawi. *Emerging Infectious Diseases*; 20:1957–9.
- Fluit, A. C. (2005) Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43, 1-11.
- Foley, S. L. & Lynne, A. M. (2008) Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, 86, 173-187.
- Francisco, M., Costa, S. S., Belas, A., Ramos, J., Couto, I., Pomba, C., Viveiros, M. (2018) First report on antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhi isolated from human specimens in Luanda, Angola. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 246-249.
- Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2013) Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Frontiers in Microbiology*, 4, 135.
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D. M., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F. J. & Wegener, H. C., World Health Organization Global Salm-Surv (2006) Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 381-388.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J. & Van Immerseel, F. (2009) Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 718-738.
- Gay, K. Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C. H., Jacoby, G., Barrett, T. J., Medalla, F., Chiller, T. M.; & Hopper, D. C. (2006) Plasmid-mediated quinolone resistance in non - Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 297-304.
- Garcia-Migura, L., Hendriksen, R. S., Fraile, L., & Aarestrup, F. M. (2014) Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 170(1-2), 1-9.
- Gatto, A. J., Peters, T. M., Green, J., Fisher, I. S., Gill, O. N., O'Brien, S. J., Maguire, C., Berghold, C., Lederer, I., Gerner-Smidt, P., Torpdahl, M., Siitonen, A., Lukinmaa, S., Tschäpe, H., Prager, R., Luzzi, I., Dionisi, A. M., van der Zwaluw, W. K., Heck, M., Coia, J., Brown, D., Usera, M., Echeita, A., & Threlfall, E. J. (2006) Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries, 2000-2004: results of an international multi-centre study. *Epidemiology and Infection*, 134 (4), 726-736.
- Gebreyes, W. A., Davies, P. R., Turkson, P. K., Morrow, W. E., Funk, J. A. & Altier, C. (2004) *Salmonella enterica* serovars from pigs on farms and after slaughter and validity of using bacteriologic data to define herd *Salmonella* status. *Journal of Food Protection*, 67(4), 691-697.

- Geimba, M. P., Tondo, E. C., & Brandelli, A. (2005) Antimicrobial resistance in *Salmonella Enteritidis* isolated from foods involved in human foodborne outbreaks occurred in the South of Brazil, 1999 –2000. *Journal of Food Safety*, 25, 173-182.
- Ghaderi, R., Tadayon, K., Khaki, P., & Mosavari, N. (2015) Iranian clonal population of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, characterized by multi-locus sequence typing (MLST) method. *Iran Journal of Microbiology*, 7(5), 251-259.
- Giraud, E., Baucheron, S., & Cloeckart, A. (2006) Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infection*, 8, 1937-1944.
- Gopinath, S., Carden, S. & Monack, D. (2012) Shedding light on *Salmonella* carriers. *Trends in Microbiology*, 20(7), 320-328.
- Graham, S. M., Molyneux, E. M, Walsh, A. L, Cheesbrough J. S., Moleneux, M. E, & Hart, C. A. (2000) Nontyphoidal *Salmonella* infections of children in tropical Africa. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 19, 1189-96.
- Grimont, P.A.D., & Weil, F.-X. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (WHOCC-Salm) (9th ed.): Institute Pasteur, Paris.
- Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J. M., Olsen, J. E., & Dalsgaard. (2000) A distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 49, 929-936.
- Guerin, P. J., Vold, P. & Aavitsland, P. (2005) Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: A case study in Norway. *Euro Surveillance*, 10(3), 48-50.
- Guerra, B., Laconcha, I., Soto, S. M., González-Hevia, M. A., & Mendoza, M. C. (2000) Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiology Letters*, 190, 341-347.
- Guerra, B., Soto, S. M., Arguelles, J. M., & Mendoza, M. C. (2001) Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45, 1305-1308.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., & Helmuth, R. (2003) Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 489-492.
- Guerra, B., Junker, E., Miko, A., Helmuth, R., & Mendoza, M. C. (2004) Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype typhimurium strains. *Microbial Drug Resistance*, 10, 83-91.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemühl, J., Grimont, P. A. & Weill, F. X. (2010) *Research in Microbiology*, 161(1), 26-29.

- Haimovich, B., & Venkatesan, M. M. (2006) *Shigella* and *Salmonella*: death as a means of survival. *Microbes and Infection*, 8(2), 568-577.
- Hanson, N. D., Moland, E. S., Hossain, A., Neville, S. A., Gosbell, I. B., & Thomson, K. S. (2002) Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 1011-1014.
- Harish, B. N., Menezes, G. A., Sarangapani, K., & Parija, S. C. (2008) A case report and review of the literature: ciprofloxacin resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi in India. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2 (4), 324-7.
- Hauser, E., Tietze E., Helmuth, R., Junker, E., Blank, K., Prager, R., Rabsch, W., Appel, B., Fruth, A., & Malorny, B. (2010) Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (14), 4601-4610.
- Helms, M., Ethelberg, S. & Mølbak, K., DT104 Study Group. (2005) International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 859-867.
- Hendriksen, S. W., Orsel, K., Wagenaar, J. A., Miko, A., & van Duinkerken, E. (2004) Animal-to-human transmission of *Salmonella* Typhimurium DT104A variant. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 22-27.
- Herrero, A., Rodicio, M. R., González-Hevia, M. A., & Mendoza, M. C. (2006) Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 39-45.
- Hodges, J. R. & Kimball, A. M. (2005) The global diet: trade and novel infections. *Global Health*, 1, 4.
- Hohmann, E. L. (2001) Nontyphoidal salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 263-269.
- Hollingshead, S., & Vapnek, D. (1985) Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase. *Plasmid*, 1:17-30.
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005) Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 358-373.
- Hopkins, K. L., Kirchner, M., Guerra, B., Granier, S. A., Lucarelli, C., Porrero, M. C., *et al.* (2010) Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Eurosurveillance*, 15, 19, 580.
- Huang, H., Garcia, M. M., Brooks, B. W., Nielsen, K., & Ng, S. P. (1999) Evaluation of culture enrichment for use with *Salmonella* detection in Immunoassay. *International Journal of Food Microbiology*, 51(23), 85-94.

- Huang, Y., Ghate, V., Phua, L., & Yuk, H. G. (2012) Prevalence of *Salmonella* and *Vibrio* spp. in seafood products soil in Singapore. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1320-1323.
- Hunter, S. B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M. A., van Duyne, M. S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T., & Ribot, E. (2005) Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (3), 1045-1050.
- Ido, N., Kudo, T., Sasaki, K., Motokawa, M., Iwabuchi, K., Matsudate, H., Seimiya, Y. M., & Akiba, M. (2011) Molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i:- isolated from cattle and humans in Iwate Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73 (2), 241-244.
- ISO 6579: (1993) Microbiology General Guidance on Methods for the Detection of Salmonella. *International Organization of Standardization*, Geneva, Switzerland.
- ISO 6579: (2002) Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland.
- INFOSAN: (2010) International Food Safety Authorities Network progress report 2004 – 2010.
- Jain P., Sudhanthirakodi S., Chowdhury G., Joshi S., Anadan S., Ray U *et al.* (2018). Antimicrobial resistance, plasmid, virulence, multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clinical and environmental isolates from India. *PloS ONE* 13(12): e0207954. Published 2018 Dec 12. doi:10.1371/journal.pone.0207954
- Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Carroll, K. C., Funke, G., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. . (2015) *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition – ASM science. www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381
- Jawetz, M., & Adelberg, E. (2006) Microbiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- De Sousa Junior, M. A., Ferreira, E. S., & Conceição, G. C. (2004) Beta –lactamases de espectro Ampliado (ESBL): Um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *NewsLab* 63, 152-174.
- Jure, M. A., Duprilot, M., Musa, H. E., López, C., de Castillo, M. C., Weill, F. X., Arlet, G., & Decré, D. (2014) Emergence of KPC-2-producing *Salmonella enterica* serotype Schwarzengrund in Argentina. *Antimicrobial Agents Chemothererapy*, 58(10), 6335-6336.
- Kagambèga, A., Lienemann, T., Frye, J. G., Barro, N., & Haukka, K. (2018) Whole genome sequencing of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from humans and poultry in Burkina Faso. *Tropical Medicine and Health*, 12 (46), 4.

- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., & Achtman, M. (2002) *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 yearsold. *Infection, Genetics and Evolution*, 2 (1), 39-45.
- Kim, S. Y., Lee, S. K. Park, M. S., Na, H. T. (2016) Analysis of *Salmonella enterica* resistance mechanism to fluoroquinolone. *Journal of Microbiology & Biotechnolohy* (26), 1605-1612.
- Kim, H., & Bhunia, A. K. (2008) SEL, a selective enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (15), 4853-4866.
- Kim, Y., Bae, I. K., Jeong, S. H., Lee, C. H., Lee, H. K., Ahn, J., Lee, M. K., Lee, S., & Lee, K. (2011) Occurrence of IncFII plasmids carrying the *bla*_{CTX-M-15} gene in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis sequence type 11 in Korea. *Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases*, 71(2), 171-173.
- Kingsley, R. A., Msefula, C. L, Thomson, N. R, Kariuki, S., Holt, K. E., Gordon, M. A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, M. E., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, C. A., Heyderman, R. S., & Dougan, G. (2009) Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-saharan Africa have a distint genotype. *Genome Research*, 19(12), 2279-2287.
- Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., Crump, J. A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C. L., Hald, T., Hall, A. J., Keddy, K. H., Lake, R. J., Lanata, C. F., Torgerson, P. R., Havelaar, A. H. & Angulo, F. J. (2015) World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. *PLoS Medicine*, 12(12), e1001921. Erratum in: *PLoS Medicine*, (2015), 12(12), e1001940.
- Kiss, J., Papp, P. P., Szabó, M., Farkas, T., Murányi, G., Szakállas, E., & Olsasz, F. (2015) The master regulator of IncA/C plasmids is recognized by the *Salmonella* genomic island SGI1 as a signal for excision and conjugal transfer. *Nucleic Acids Research*, 43(18), 8735–8745.
- Koneman, E. W, Allen, S. D., Janda, W. M., & Schreeckenberger, P. C. (1997) Color atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott, USA.
- Kongsoi, S., Changkwanyeeun, R., Yokoyama, K., Nakajima, C., Changkaew, K., Suthienkul, O., & Suzuki, Y. (2016) Amino acid substitutions in GyrA affect quinolone susceptibility in *Salmonella typhimurium*. *Drug Testing and Analysis*, 8, 1065-1070.
- Ktari, S., Ksibi, B., Gharsallah, H., Mnif, B., Maalej, S., Rhimi, F., & Hammami, A. (2016) Molecular epidemiological characteristics of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium and Livingstone strains isolated in a Tunisian university hospital. *APMIS*.124(3), 194-200.

- Kumar, S., Mukherjee, M. M., & Varela, M. F. (2013) Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *International Journal of Bacteriology*, 2013; pii: 204141.
- Kurosawa, A., Imamura, T., Tanaka, K., Tamamura, Y., Uchida, I., Kobayashi, A., Hata, E., Kanno, T., Akiba, M., Yukawa, S. & Tamura, Y. (2012) Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 4,5,12:i:- isolates from cattle by multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis. *Veterinary Microbiology*, 160(1-2), 264-268.
- Lee, H. Y., Su, L. H., Tsai, M. H., Kim, S. W., Chang, H. H., Jung, S. I., Park, K. H., Perera, J., Carlos, C., Tan, B. H., Kumarasinghe, G., So, T., Chongthaleong, A., Hsueh, P. R., Liu, J. W., Song, J.H., & Chiu, C. H. (2009) High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among non typhoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 2696–2699.
- Leekitcharoenphon, P., Friis, C., Zankari, E., Svendsen, C. A., Price, L. B., Rahmani, M., Herrero-Fresno, A., Fashae, K., Vandenberg, O., Aarestrup, F. M., & Hendriksen, R.S. (2013) Genomics of an emerging clone of *Salmonella* serovar Typhimurium ST313 from Nigeria and the Democratic Republic of Congo. *Journal of Infection in Developing Countries*, 7(10), 696-706.
- Lemarchand, K., & Lebaron, P. (2002) Influence of mutation frequency on the persistence of *Salmonella enterica* serotypes in natural waters. *FEMS Microbiology and Ecology*, 41, 125-31.
- Levin, R. E. (2009) The use of molecular methods for detecting and discriminating *Salmonella* associated with foods – a review. *Food Biotechnology*, 23 (4), 313-367.
- Levy, S. B. (2000) The future of antibiotics: Facing antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Infection*, 6, 101-106.
- Liebana, E., Carattoli, A., Coque, T. M., Hasman, H., Magiorakos, A. P., Mevius, D., Peixe, L., Poirel, L., Schuepbach-Regula, G., Torneke, K., Torren-Edo, J., Torres, C., & Threlfall, J. (2013) Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clinical Infectious Diseases*, 56(7), 1030-1037.
- Lin, D., Chen, K., Wai-Chi Chan, E., & Chen, S. (2015) Increasing prevalence of ciprofloxacin-resistant food-borne *Salmonella* strains harboring multiple PMQR elements but not target gene mutations. *Scientific Reports*, 5, 14754.
- Lindstedt, B.-A., Heir, E., Nygard, I., & Kapperud, G. (2003) Characterization of class 1 integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 141-149.
- Lucarelli, C., Dionisi, A. M, Torpdahl, M., Villa, L., Graziani, C., Hopkins, K., Threlfall, J., Caprioli, A., & Luzzi, I. (2010) Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar

- Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark and the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (6),2103-2109.
- Lynch, M., Painter, J., Woodruff, R. & Braden, C., Centers for Disease Control and Prevention. (2006) Surveillance for foodborne-disease outbreaks—United States, 1998-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries*, 55(10), 1-42.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., & Helmuth, R. (2003) Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1),290-296.
- Mandomando, I., Bassat, Q., Sigaúque, B., Massora, S., Quintó, L., Ácacio, S., Nhampossa, T., Vubil, D., Garrine, M., Macete, E., Aide, P., Saco, C., Herrera-León, S., Ruiz, J., Tennant, S. M., Menéndez, C., & Alonso, P. L. (2015) Invasive *Salmonella* infections among children from rural Mozambique, 2001-2004. *Clinical Infectious Diseases*. 61 (S4): S339-45.
- Maqka, L., & Popowska, M. (2016) Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 67(4), 343-358.
- Maynard, C., Fairbrother, J. M., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., & Harel, J. (2003) Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10),3214-3221.
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., & Davies, J. (2000) Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (6),1568-1574.
- Mastroeni P, Grant A, Restif O, & Maskell D. (2009) A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 73-80.
- Martínez-Gamboa A., Silva C., Fernández-Mora M., Wiesner M., Ponce de León A., Catva E. (2015). IS200 and multilocus sequence typing for the identification of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains from Indonesia. *Int. Microbiol* 18 99-104.
- McDougal, L. K., Steward, C. D., Killgore, G. E., Chaitram, J. M., McAllister, S. K., & Tenover, F. C. (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5113-5120.
- McManus M C. (1997) Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agentes. *American Journal of Health System Pharmacy*, 54,1420-1433.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. & Tauxe, R. V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625.

- Melloul, A. A., Hassani, L. & Rafouk, L. (2001) *Salmonella* contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17:207-209.
- Michael, G. B., Butaye, P., Cloeckeaert, A., & Schwarz, S. (2006) Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. *Microbes and Infection*, 8, 1898-1914.
- Michael, G. B., & Schwarz, S. (2016) Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend? *Clinical Microbiology Infection*, 22(12), 968-974.
- Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., & Helmuth, R. (2005) Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 1025-1033.
- Millemann, Y., Lesage, M. C., Chaslus-Dancla, E., & Lafont, J.P. (1995) Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella* Typhimurium and *S. Enteritidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (1), 173-179.
- Mims, C., Playfair, J., & Roitt, I. (2005) *Microbiologia médica*. Elsevier, 64 (2): 79-83.
- Miriagou, V., Carattoli, A., & Fanning, S. (2006) Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes and Infection*, 8(7), 1923-1930.
- Miriagou, V., Tassios, P. T., Legakis, N. J., & Tzouveleakis, L. S. (2004) Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 547-555.
- Mølbak, K., Baggesen, D. L., Aarestrup, F. M., Ebbesen, J. M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A. M., & Wegener, H. C. (1999) An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. *The New England Journal of Medicine*, 341, 1420-1425.
- Mitakakis, T., Sinclair, M., Fairley, C., Lightbody, P., Leder, K., & Hellard, M. (2004) Food safety in family homes in Melbourne, Australia. *Journal of Food Prevention*, 64(4), 818-822.
- Molbak, K., Gerner-Smidt, P., & Wegener, H. C. (2002) Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. *Emerging Infectious Disease*, 28, 514-515.
- Mossong, J., Marques, P., Ragimbeau, C., Huberty-Krau, P., Losch, S., Meyer, G., Moris, G., Strottner, C., Rabsch, W. & Schneider, F. (2007) Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4, [5],12:i:- in Luxembourg, 2006. *Euro Surveillance*. 12, E11-E12.
- Monack, D. M. (2012) *Salmonella* persistence and transmission strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 15, 100-117.
- Mulvey, M. R., Boyd, D. A., Olson, A. B., Doublet, B., & Cloeckeaert, A. (2006) The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes and Infection*, 8, 1915-1922. ,

- Mulvey, M. R., Finley, R., Allen, V., Ang, L., Bekal, S., El Bailey, S., Haldane, D., Hoang, L., Horsman, G., Robberts, M. L. L., Wylie, J., McCracken, M., Langner, S., Ahmed, R., Tabor, H., & Gilmour, M. (2013) Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- involving human cases in Canada: results from the Canadian Integrated Program on Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), 2003–10. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 1982-1986.
- Murgia M, Rubino S, Wain J, Gaiand R, & Paglietti B. (2016) A novel broadly applicable PCR-RFLP method for the rapid identification and subtyping of H58 *Salmonella* Typhi. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 219-223.
- Mweu, E., & English, M. (2008) Typhoid fever in children in Africa. *Tropical Medicine and Health*, 13, 532-40.
- Navia, M. M., Ruiz, J., Sanchez-Cespedes, J. & Vila, J. (2003) Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46, 295-298.
- Nishino, K., Latifi, T., & Groisman, E. A. (2006) Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 59, 126-141.
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., De Kruif, A., De Zutter, L. & Maes, D. (2005) *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research*, 34(4), 645-656.
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G, Poirel, L., Woodford, N., & Miriagou, V., European Network on Carbapenemases. (2012) Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), 432-438.
- Ohl, M. E., & Miller, S. I. (2001) *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52, 259-274.
- Oliveira, C. J., Garcia, T. B., Carvalho, L. F., & Givisiez, P. E. (2007) Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. *Veterinary Microbiology*, 125, 355-361.
- Organização Mundial da Saúde (2005) Drug-Resistant *Salmmonella*. *Fact Sheet* nº139. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs139/en/>
- Organização Mundial de Saúde (OMS). (2012) Critically important antimicrobials for human medicine. Atualizações disponíveis em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf?e=1&ua=1.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). (2015) Estimates of the global burden of foodborne diseases. Fact sheet Nº 399. Atualizações disponíveis: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/ (acedido a 15/02/2018)

- Organização Mundial de Saúde (OMS). (2017) Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Disponível em: http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1
- Okoro, C. K., Kingsley, R.A., Connor, T. R., Harris, S.R., Parry, C. M., Al-Mashhadani, M. N., Kariuki, S., Msefula, C. L., Gordon, M. A., de Pinna, E., Wain, J., Heyderman, R. S., Obaro, S., Alonso P. L., Mandomando, I., MacLennan, C. A., Tapia, M. D., Levine, M. M., Tennant, S. M., Parkhill, J., Dougan, G. (2012) Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nature Genetics*; 44:1215–21.
- Papadopoulos, T., Petridou, E., Zdragas, A., Mandilara, G., Nair, S., Peters, T., Chattaway, M., de Pinna, E., Passiotou, M., & Vatopoulos, A. (2016) Comparative study of all *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains isolated from food and food animals in Greece from 2008 to 2010 with clinical isolates. *European Journal of Clinical Microbiological Infectious Diseases*, 35(5),741-746.
- Parry, C. M. (2003) Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16, 467–472.
- Pasquali, F., Kehrenberg, C., Manfreda, G., & Schwarz, S. (2005) Physical linkage of *Tn3* and part of *Tn1721* in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 562-565.
- Patchanee, P., Tadee, P., & Chotinun, S. (2015) Dissemination of *Salmonella enterica* sequence types among asean economic community countries. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 46(4), 707-19.
- Pechère, J. C., Hughes, D., Kardas, P., & Cornaglia, G. (2007) Non-compliance with antibiotic therapy for acute community infections: A global survey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 245–253.
- Peirano, G., Agersø, Y., Aarestrup, F. M., dos Reis, E. M., dos Prazeres Rodrigues, D. (2006) Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 305-309.
- Pereira, R. E. P., & Petrechen, G. G. (2011) Principais métodos diagnósticos bacterianos – Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça*, 16, 1- 12.
- Pérez-Pérez, & F. J., Hanson, N. D. (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 2153-62.
- Perreten, V., & Boerlin, P. A. (2003) new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 47, 1169-1172.

- Pezzella, C., Ricci, A., DiGiannatale, E., Luzzi, I., & Carattoli, A. (2004) Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(3), 903-908.
- Penha Filho, R. A., de Paiva, J. B., da Silva, M. D., de Almeida, A. M., & Berchieri, A. Jr. (2010) Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. *Vaccine*, 28(16), 2853-2859.
- Pomba, C., Mendonça, N., Costa, M., Louro, D., Baptista, B., Ferreira, M., Correia, J. D., & Caniça, M. (2006) Improved multiplex PCR method for the rapid detection of β -lactamase genes in *Escherichia coli* of animal origin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 56, 103-106.
- Pokharel, B. M., Koirala, J., Dahal, R. K., Mishra, S. K., Khadga, P. K., & Tuladhar, N. R. (2006) Production of resistant and wide-spectrum beta-lactamases (ESBL) *Salmonella enterica* (Typhi and Paratyphi A serotypes) Isolated from blood in Nepal: Resistance surveillance and search for new alternatives. *International Journal of Infectious Diseases*, 10 (6), 434-438.
- Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Nillian, E., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. & Radu, S. (2011) Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control*, 22, 337-342.
- Quinn, T., O'Mahony, R., Baird, A. W., Drudy, D., Whyte, P., & Fanning, S. (2006) Multi-drug resistance in *Salmonella enterica*: efflux mechanisms and their relationships with the development of chromosomal resistance gene clusters. *Current Drug Targets*, 7, 849-860.
- Rabsch, W., Tschäpe, H., Bäumler, A. J. (2001) Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection*, 3, 237-247.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Osborn, M. K., Piddock, L. J. & Woodward, M. J. (2004) Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 208-216.
- Ribeiro, V. B., Lincopan, N., Landgraf, M., Franco, B. D., & Destro, M. T. (2011) Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2); 685–692.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 6, 629-40.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Bush, K., & Hooper, D. C. (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12, 83-88.

- Rodrigues, D. P., Lazaro, N. S., & Reis, E. M. F. (2008) Manual de procedimentos para diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp. Rio de Janeiro: Fiocruz. 48 p.
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004) Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3996-4001.
- Salehi, T. Z., Mahzounieh, M., & Saeedzadeh, A. (2005) Detection of invA gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. *International Journal of Poultry Science*. 4(8), 557-559.
- Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A. & Gómez-Duarte, O. G. (2011) *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 9, 263-277.
- Santos, L. R., Nascimento, V. P., Flores, M. L., Rosek, H., D'Andrea, A., Albuquerque, M. C., Rampanelli, Y., Machado N. P., Rios, S. & Fernandes, S. A. (2002) *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar*, 16(102/103), 93-99.
- Schlundt, J., Toyofuku, H., Jansen, J., Herbst, S. A. (2004) Emerging food-borne zoonoses, *Reviews in Science and Technology*. 23, 513-33.
- Shinohara, N. K. S., Barros, V. B., Jimenez, S. M. C., Machado, E. C. L., Dutra, R. A. F., & Filho, J. L. L. (2008) *Samonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13(5), 1675-1683.
- Silva, C., Calva, E. & Maloy, S. (2014) One Health and food-borne disease: *Salmonella* transmission between humans, animals, and plants. *Microbiology Spectrum*, 2(1), OH-0020-2013.
- Sköld, O. (2001) Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*, 32, 261-273.
- Sköld, O. (2000) Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3, 155-160.
- Smith, S. I., Seriki, A., & Ajayi, A. (2016) Typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* infections in Africa. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 35(12), 1913-1922.
- Shelobolina, E. S., Sullivan, S. A., O'Neill, K. R., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2004) Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella* Subterranea. *Applied Environmental Microbiology*, 70(5):2959-2965.

- Stevenson, J. E., Gay, K., Barrett, T. J., Medalla, F., Chiller, T. M., & Angulo, F. J. (2007) Increase in nalidixic acid resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates in the United States from 1996 to 2003, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 195–197.
- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453, 254-267.
- Suresh, T., Hatha, A. A. M., Sreenivasan, D., Sangeetha, N. & Lashmanaperumalsamy, P. (2006) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retails markets of Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 23(3), 294-299.
- Susan, C., Morpeth Habib, O., Ramadhani, & Crump, J. A. (2009) Invasive non -Typhi disease in Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 606-611.
- Switt, A. I., Soyer, Y., Warnick, L. D., & Wiedmann M. (2009) Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 407-415.
- Taconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U. & Magrini, N.; WHO Pathogens Priority List Working Group. (2018) *Lancet Infectious Diseases*, 18 (3), 318-327.
- Taitt, C. R., Shubin, Y. S., Angel, R. & Ligler, F. S. (2004) Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by using a rapid, array-based immunosensor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 152-158.
- Tannock, G. W., Fuller, R., Smith, S. L., & Hall, M. A. (1990) Plasmid profiling of members of the family *Enterobacteriaceae*, lactobacilli and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (6), 1225-1228.
- Tenover, F. C. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119, S3-S10.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P.A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995) Interpreting patterns produced by Pulsed-field gel electrophoresis: criteria for strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.
- Thai, T. H., Hirai, T., Lan, N. T., Shimada, A., Ngoc, P. T., & Yamaguchi, R. (2012) Antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from beef at retail markets in the North Vietnam. *The Journal Veterinary of Medical Science*, 74, 1163-1169.
- Threlfall, E. J., Fisher, I. S., Berghold, C., Gerner-Smidt, P., Tschape, H., Cormican, M., Luzzi, I., Schnieder, F., Wannet, W., Machado, J., & Edwards, G. (2003) Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans

- in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveillance*, 8, 41- 45.
- Threlfall, E. J. (2002) Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 141–148.
- Threlfall, E. J. (2000) Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104: a truly international multiresistant clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46:7–10.
- Tondo, E. C., & Ritter, A. C. *Salmonella* and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade *Salmonella*: Classification, Genetics and disease Outbreaks, First edition, New York: *Nova Science Publishers*, 2012; 267p.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2012) Microbiology. 10^aed. Armed: Porto Alegre
- Tosini, F., Visca, P., Luzzi, I., Dionisi, A. M., Pezzella, C., Petrucca, A., & Carattoli, A. (1998) Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42, 3053-3058.
- Trabulsi, L. R. (2009) Mecanismo de ação dos antimicrobianos. In: Microbiologia. Trabulsi, L. R., Alterthum, F., Gombertz, O. F. & Cadeias, J. A. N. 3^aed. Atheneu: São Paulo.
- Turner, P. E., Cooper, V. S., & Lenski, R. E. (1998) Trade off between horizontal and vertical modes of transmission in bacterial plasmids. *Evolution*, 52, 455-469.
- Uche, I. V., MacLennan, C. A., & Saul, A. (2017) A systematic review of the incidence, risk factors and case fatality rates of invasive nontyphoidal *Salmonella* (iNTS) disease in Africa (1966 to 2014). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1), e0005118.
- Ukuku, D. O. (2006) Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*. *Food Microbiology*, 23(3), :289-293.
- Usha, G., Chunderika, M., Prashini, M., Willem, S. A., & Yusuf, E. S. (2008) Characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella* spp. at a tertiary hospital in Durban, South Africa. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 62 (1), 86-91.
- Vanegas, R. A. & Joys, T.M. (1995) Molecular analyses of the phase-2 antigen complex 1,2of *Salmonella* spp. *Journal of Bacteriology*, 177, 3863-3864.
- Velge, P., Cloeckaert, A., & Barrow, P. (2005) Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, 36(3), 267-288.
- Villa, L., & Carattoli, A. (2005) Integrons and transposons on the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49, 1194-1197.

- Viveiros, M., Dupont, M., Rodrigues, L., Couto, I., Davin-Regli, A., Martins, M., Pagès, J. M. & Amaral, L. (2007) Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E.coli*. *PLoS One*, 2(4), e365.
- Vo, A. T, van Duijkeren, E., Fluit, A. C., & Gastra, W. (2007) A novel *Salmonella* genomic island 1 and rare integron types in *Salmonella* Typhimurium isolates from horses in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4),594-599.
- Volf, J., Stepanova, H., Matiasovic, J., Kyrova, K., Sisak, F., Havlickova, H., Leva, L., Faldyna, M. & Rychlik, I. (2012) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis infection of pigs and cytokine signalling in palatine tonsils. *Veterinary Microbiology*, 156(1-2), 127-35.
- Wain, J., Shendriksen, R., Mascp, M. L. M., Keddy, K. H., & Ochiai, R. L. (2015) Typhoid fever. *The Lancet*, 385(9973), 1136-1145.
- Wang, Y.-C., Chang, Y.-C., Chuang, H.- L., Chiu, C.-C., Yeh, K-S., Chang, C.-C., Hsuan, S.-L., & Chen, T. H. (2010) Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among *Salmonella Schwarzengrund* in boiler chicken and pig. *African Journal of Microbiology Research*, 9, 677-681.
- Wang, Y., Zhang, A., Yang, Y., Lei, C., Jiang, W., Liu, B., Shi, H., Kong, L., Cheng, G., Zhang, X., Yang, X., & Wang, H. (2017) Emergence of *Salmonella enterica* serovar Indiana and California isolates with concurrent resistance to cefotaxime, amikacin and ciprofloxacin from chickens in China. *International Journal of Food Microbiology*, 262, 23-30.
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D. C., & Wang, M. (2009) New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1892-1897.
- Wang H. Q., Pan J. C., Zhang W., Zheng W., Yu H., Meng D. M. (2009). Multilocus sequence typing of *Salmonella* Typhi isolates in Hangzhou. *Chin. J. Health Lab. Tech.* 8 18.
- Wattiau P, Boland C & Bertrand S. (2011) Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (22), 7877-7885.
- Wells, S. J., Fedorka-Cray, P. J., Dargartz, D. A., Ferris, K., & Green, A. (2001) Fecal shedding of *Salmonella* spp. by dairy cows on farm and at cull cow markets. *Journal of Food Protection*, 64(1), 3-11.
- Wong VK, Baker S, Pickard DJ, Parkhill J, Page AJ, Feasey NA, Kingsley RA, Thomson NR, Keane JA, Weill FX, Edwards DJ, Hawkey J, Harris SR, Mather AE, Cain AK, Hadfield J, Hart PJ, Thieu NT, Klemm EJ, Glinos DA, Breiman RF, Watson CH, Kariuki S, Gordon MA, Heyderman RS, Okoro C, Jacobs J, Lunguya O, Edmunds WJ, Msefula C, Chabalgoity JA, Kama M, Jenkins K, Dutta S, Marks F, Campos J, Thompson C, Obaro S, MacLennan CA, Dolecek C, Keddy KH, Smith AM, Parry CM, Karkey A, Mulholland EK, Campbell JI, Dongol S, Basnyat B, Dufour M, Bandaranayake D, Naseri TT, Singh SP, Hatta M, Newton P, Onsare RS, Isaia L, Dance D, Davong V, Thwaites G,

- Wijedoru L, Crump JA, De Pinna E, Nair S, Nilles EJ, Thanh DP, Turner P, Soeng S, Valcanis M, Powling J, Dimovski K, Hogg G, Farrar J, Holt KE, & Dougan G. (2015) Phylogeographical analysis of the dominant multidrug-resistant H58 clade of *Salmonella typhi* identifies inter- and intracontinental transmission events. *Nature Genetics*.47, 632–639.
- Xia, W., Xu, T., Qin, T., Li, P., Liu, Y., Kang, H., & Ma, P. (2016) Characterization of integrons and novel cassette arrays in bacteria from clinical isolates in China, 2000–2014. *Journal of Biomedical Research*, 30(4), 292–303.
- Yanat, B., Rodríguez-Martínez, J. M., & Touati, A. (2017) Plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(3), 421–435.
- Yang, B., Xi, M., Cui, S., Zhang, X., Shen, J., Sheng, M., Qu, D., Wang, X., & Meng, J. (2012) Mutations in gyrase and topoisomerase genes associated with fluorquinolone resistance in *Salmonella* serovars from retail meats. *Food Research International*, 45, 935–939.
- Yang, S. J., Park, K. Y., Kim, S. H., No, K. M., Besser, T. E., Yoo, H. S., Kim, S. H., Lee, B. K., & Park, Y. H. (2002) Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Veterinary Microbiology*. 86, 295–301.
- Yan, S. S., Pedrak, M. L., Abela-Ridder, B., Punderson, J. W., Fedorko, D. P. & Foley, S. L. (2003) An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4, 189–204.
- Yap K-P, Ho, W. S., Gan, H. M., Chai, L. C., & Thong, K. L. (2016) Global MLST of *Salmonella Typhi* revisited in post-genomic era: genetic conservation, population structure, and comparative genomics of rare sequence types. *Frontiers in Microbiology*.7, 270.
- Zhang, C. Z., Chen, P. X., Yang, L., Li, W., Chang, M. X., & Jiang, H. X. (2017) Coordinated expression of *acrAB-tolC* and eight other functional efflux pumps through activating *ramA* and *marA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial Drug Resistance*, [Epub ahead of print], doi: 10.1089/mdr.2017.0086.
- Zhang H., Zhang X., Yan M., Pang B., Kan B., Xu H., et al. (2011). Genotyping of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains isolated from 1959 to 2006 in China and analysis of genetic diversity by genomic microarray. *Croat. Med. J.* 52 688–693.
- Zhao, X., Gao, Y., Ye, C., Yang, L., Wang, T., & Chang, W. (2016) Prevalence and Characteristics of *Salmonella* isolated from Free-Range Chickens in Shandong Province, China. *Biomedical Research International*,:8183931.